

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Caractérisation de RicA, une protéine sécrétée par *Brucella abortus*

Philippe, Benjamin

*Award date:*  
2010

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Caractérisation de RicA, une protéine sécrétée par *Brucella abortus***

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Benjamin PHILIPPE

Janvier 2010

## **Caractérisation de RicA, une protéine sécrétée par *Brucella abortus***

PHILIPPE Benjamin

### Résumé :

*Brucella abortus* est une bactérie pathogène intracellulaire dont la virulence est reliée à sa capacité à proliférer dans différents types de cellules à l'intérieur d'organelles dérivées du réticulum endoplasmique. Dans le but de mettre en place ces organelles, *B. abortus* modifie le trafic vésiculaire. Une telle modification est également retrouvée chez d'autres pathogènes, tels que *Legionella pneumophila* et *Salmonella enterica* et nécessite la sécrétion de protéines effectrices permettant, entre autres, une modulation du trafic vésiculaire intracellulaire normal de la cellule hôte. Néanmoins, bien que le système de sécrétion de type IV de *B. abortus* ait été montré nécessaire à sa prolifération intracellulaire, aucune protéine sécrétée de *Brucella spp.* avec une fonction effectrice n'est connue. Dans le cadre de la recherche de protéines effectrices, un crible double-hybride permet de montrer l'interaction entre RicA, une protéine de *Brucella spp.*, et Rab2, une petite GTPase. Un test de sécrétion *in vitro* permet de montrer la sécrétion de 3Flag-RicA et de RicA-3Flag par *B. abortus*. De plus, des études utilisant un mutant de délétion pour *ricA* suggèrent que RicA aurait un effet sur la cinétique du trafic intracellulaire de *B. abortus*. Ces particularités de RicA, suggérant un caractère effecteur de cette protéine, nous ont poussés à tenter de caractériser sa sécrétion ainsi que son effet sur la cellule eucaryote.

Dans le but de déterminer les acides aminés impliqués dans la sécrétion de RicA, l'utilisation du test de sécrétion *in vitro* afin de tester la sécrétion de formes mutées de RicA gardant leur capacité d'interaction avec Rab2 fut proposée comme approche expérimentale. Des souches de *B. abortus* 2308 produisant des formes mutées de la fusion 3Flag-RicA de manière stable ont été isolées et permettront de procéder au test de sécrétion *in vitro*. Afin de caractériser l'effet de RicA sur la cellule hôte, la levure *Saccharomyces cerevisiae* fut proposée comme modèle eucaryote dans une approche expérimentale se basant sur la production de protéines bactériennes en levure. Cette approche a consisté à mettre au point un test utilisant des protéines rapportrices comme témoin de l'état du trafic vésiculaire en levure résultant de la production des protéines bactériennes. L'utilisation de LidA, un effecteur de *L. pneumophila*, permet de mettre au point le test. RicA fut également employé dans ce test et ne semble pas avoir un effet modulateur sur le trafic de la levure visible dans notre test. L'utilisation de RicA dans ce test permet de montrer une forte toxicité de RicA pour la levure, suggérant son caractère effecteur.

## Remerciements

Dans un premier temps, je voudrais remercier toutes les personnes sans qui ce mémoire n'aurait pas été possible, ce qui inclut toutes les personnes ayant contribué à ma formation ainsi que vous membres de mon jury.

Je voudrais ensuite remercier mes mentors en commençant bien sûr par Mr De Bolle, l'homme qui fait perdre tout son sens à l'expression "On ne peut pas être partout à la fois". En tant que promoteur il a toujours trouvé le temps et la patience d'enrichir ma science, il a également toujours été franc envers moi et pour cela je le remercie énormément.

Je remercie aussi fortement mon mentor parmi les mentors : Marie. Je vous salue Marie pleine de patience, Einchwin est avec toi... Je te remercie pour le temps que tu as consacré à tenter d'aller contre mon matériel génétique me forçant à être tête en l'air. Je te remercie de m'avoir aidé à faire mes armes et à apprendre à avoir confiance en moi.

Je remercie également Mr Letesson qui, en plus d'une partie de sa connaissance, m'a aussi transmis, avec l'aide des TP de Richard, sa passion qui a fait de moi le scientifique que je suis. Je voudrais aussi remercier Mr Hermand qui, grâce à son savoir sur la levure (non Charles on ne parle pas de bière), ainsi que ses présences tardives au laboratoire, a contribué à l'obtention de certains de mes résultats. Merci aussi à Mr Matroule.

Je remercie aussi toute l'équipe de l'URBM pour son accueil. Je remercierai cependant plus particulièrement certaines personnes pour leur aide lors de mon parcours en tant que mémorant. Je dis donc merci (parce que encore remettre je remercie ça fait beaucoup de remercie) à Gégé, anciennement Doc-Doc, et à Cécile actuellement enceinte et pourtant déjà mère d'une belle bande de nains. Un grand merci à Charles pour sa simplicité, son avis juste et ses conseils. Je remercie aussi Mich pour ses délires, puisse-t-elle un jour se faire respecter à Charleroi. Merci aussi à Matthieu pour ces talents cinématographiques.

Je tiens également à remercier mon entourage pour son soutien. Je te dis donc merci à toi mon Amour (pas toi Franco) d'avoir plus qu'énormément participé à mon épanouissement et à ma réussite à tout niveau de ma vie. Je remercie aussi les « couillus » de l'URBM et plus particulièrement mes compagnons d'armes Franco et Thib. Merci les gars !!!! Je remercie aussi mes parents, pour leurs valeurs et leurs innombrables encouragements. Et parce que Bosret Rock's je remercie aussi mon kot pour l'incroyable soutien dont vous avez fait preuve en ces dernières semaines de mémoire. Merci à vous Ramone et Clémentine Liénart (3ème Bac pharma) pour la correction orthographique, et merci à toi Virg pour ton soutien, le chauffage et les DoggyBag. Merci aussi à toi my Wingman. Je remercie également indéfiniment ma calotte et Barney Stinson de m'avoir permis de passer outre des épreuves difficiles et de m'avoir évité une défenestration. Merci aussi à toi Pigeon "oiseau à la grise robe..." (là Charles on parle de bière, et de dés aussi).



# Liste des abréviations

Abréviation	Nom complet
ALP	Alcaline phosphatase
AMPC	Adénosine Monophosphate Cyclique
BCV	<i>Brucella</i> Containing Vacuole(s)
CPY	Carboxypeptidase Y
CRAFT	Cre Reporter Assay For Translocation
Dot/Icm	Système de sécrétion de type IV de <i>Legionella pneumophila</i>
Gal	Milieu contenant du galactose
Glu	Milieu contenant du glucose
GW	Gateway <sup>TM</sup>
Inv	Invertase
LCV	<i>Legionella</i> Containing Vacuole(s)
LidA	Lowered viability In the presence of Dot A)
LidA-S	Séquence codante de <i>lidA</i> avec un codon stop
LidA-SS	Séquence codante de <i>lidA</i> sans codon stop
LPS	Lipopolysaccharides
n.t.	non-transformé
OMV	Outer Membrane Vesicle(s)
PEPSY	Pathogen Effector Protein Screening in Yeast
PGK	Phosphogycérate kinase
RE	Réticulum Endoplasmique
RicA	Rab2 Interacting Conserved Protein A
ricA*	Allèle mutée de <i>ricA</i>
RicA*	Formes mutée de RicA
SCV	<i>Salmonella</i> Containing Vacuole(s)
Sifs	<i>Salmonella</i> -Induced Filaments
T1SS	Systèmes de sécrétion de type I
T2SS	Système de sécrétion de type II
T3SS	Systèmes de sécrétion de type III
T3SS-1	Premier T3SS de <i>Salmonella enterica</i>
T3SS-2	Second T3SS de <i>Salmonella enterica</i>
T4SS	Système de sécrétion de type IV
VirB	Système de sécrétion de type IV de <i>Brucella spp.</i>

# Table des matières

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>2</b>
1.1. LA GUERRE A L'INTERIEUR DE LA CELLULE .....	2
1.1.1. Les effecteurs bactériens (Bhavsar et al., 2007; Galan, 2009) .....	3
1.1.2. Les systèmes de sécrétion bactériens .....	4
1.1.2.1. Le système de sécrétion de type IV (Christie et al., 2005; Fronzes et al., 2009a).....	5
1.1.2.2. Les OMV (Kuehn and Kesty, 2005).....	6
1.2. RECHERCHE D'EFFECTEURS BACTERIENS .....	7
1.2.1. Construction de banques de mutants ciblés ou aléatoires .....	8
1.2.2. Les transposons (Choi and Kim, 2009; Reznikoff, 1993) .....	8
1.2.3. La levure au service de la science (Curak et al., 2009; Siggers and Lesser, 2008) .....	9
1.2.3.1. La levure et sa croissance comme rapporteur de la présence d'effecteur .....	9
1.2.3.2. La levure comme système pour identifier les protéines qui perturbent le trafic vésiculaire	10
1.2.4. Être sécrété, la première caractéristique d'un effecteur .....	11
1.2.4.1. Test de sécrétion <i>in vitro</i> .....	11
1.2.4.2. Test de sécrétion en contexte d'infection .....	11
1.2.4.2.1. CyaA, une toxine bien utile (Ladant and Ullmann, 1999) .....	11
1.2.4.2.2. Système Cre-Lox (Sauer, 1998) .....	12
1.2.4.2.3. Test $\beta$ -lactamase .....	12
1.3. IDENTIFICATION DE RICA, UN EFFECTEUR POTENTIEL DE <i>BRUCELLA SPP.</i> .....	13
<b>2. OBJECTIFS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. RÉSULTATS.....</b>	<b>17</b>
3.1. TEST DE SÉCRÉTION <i>IN VITRO</i> .....	17
3.1.1. Construction des souches .....	17
3.1.1.1. Construction des plasmides.....	17
3.1.1.2. Obtention des souches de <i>B. abortus</i> 2308 et vérification de la stabilité des protéines de fusion 3Flag-RicA .....	19
3.2. LA LEVURE AU SERVICE DE LA CARACTÉRISATION DE RICA.....	22
3.2.1. Utilisation de l'ALP et de la CPY comme rapporteurs du trafic de la levure .....	22
3.2.1.1. Première étape, obtenir les constructions et les souches.....	22
3.2.1.2. Deuxième étape, mettre au point l'extraction protéique .....	23
3.2.1.3. Troisième étape, utiliser le test mis au point pour caractériser RicA .....	28
3.2.2. Le test de croissance, un outil sensible pour détecter la présence d'effecteurs .....	29
<b>4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>32</b>
4.1. CARACTERISATION DE LA SECRETION DE RICA .....	32
4.1.1. Test de sécrétion <i>in vitro</i> .....	33
4.1.2. Test de sécrétion en contexte d'infection .....	34
4.2. CARACTERISATION DE L'ACTION DE RICA SUR LA CELLULE EUKARYOTE.....	34
4.2.1. Utilisation de l'ALP et de la CPY comme témoin de l'état du trafic vésiculaire intracellulaire de la levure .....	34
4.2.2. La croissance de la levure, reflet de son état cellulaire .....	36
4.2.2.1. Utilisation de la perte de croissance due à la présence de RicA.....	36
4.3. CONCLUSION GENERALE.....	37

<b>5. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>39</b>
5.1. SOUCHES ET PLASMIDES.....	39
5.1.1. Bactéries.....	39
5.1.2. Levures.....	39
5.1.3. Plasmides.....	39
5.2. MILIEUX, TAMPONS ET SOLUTIONS .....	40
5.2.1. Milieux bactéries.....	40
5.2.1.1. Préparation des stocks d'antibiotiques (concentrés 1000X) .....	40
5.2.1.2. Milieu LB (Luria Bertani) .....	40
5.2.1.3. Milieux riches pour <i>Brucella abortus</i> : milieu 2YT .....	40
5.2.2. Milieux pour levures .....	41
5.2.2.1. Milieu minimum .....	41
5.2.2.2. Milieu Sc (Synthétique complet).....	41
5.2.2.3. Milieu YEPD (Yeast Extract bacto-Peptide D-glucose) .....	41
5.2.3. Préparation de tampons et solutions .....	42
5.3. TECHNIQUES RELATIVES À L'ADN .....	43
5.3.1. Polymerase chain réaction (PCR).....	43
5.3.2. Clonage Gateway <sup>TM</sup> .....	45
5.3.3. Restriction enzymatique .....	46
5.3.4. Électrophorèse en gel d'agarose .....	46
5.4. TECHNIQUES RELATIVES À L'UTILISATION DE BACTÉRIES .....	47
5.4.1. Préparation de cellules chemo-compétentes (DH10B).....	47
5.4.2. Transformation bactérienne : choc thermique .....	47
5.4.3. Conjugaison .....	47
5.4.4. Analyse de la production de 3Flag-RicA* .....	48
5.4.4.1. Analyses en western blot.....	48
5.5. TECHNIQUES RELATIVES À L'UTILISATION DE LEVURES.....	49
5.5.1. Transformation levure .....	49
5.5.2. Analyse de l'ALP et de la CPY.....	49
5.5.2.1. Lyse au NaOH.....	49
5.5.2.2. Lyse aux billes de verre .....	50
5.5.2.3. Analyses en western blot.....	50
5.5.3. Test de croissance.....	50
5.6. TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTÉINES .....	51
5.6.1. Analyse par western blot.....	51
5.6.1.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) .....	51
5.6.1.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose .....	51
5.6.1.3. Immunodétection .....	51
5.6.1.4. Révélation .....	52
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>54</b>

Un problème sans solution est un problème mal posé.  
[Albert Einstein]

Il est souvent nécessaire d'entreprendre pour espérer et de persévérer pour réussir.  
[Gilbert Cesbron]

A mes frères d'armes, Franco et Thib.

# Introduction

# 1. Introduction

## 1.1. La guerre à l'intérieur de la cellule

Au sein du règne bactérien, les bactéries pathogènes ont dû s'adapter à l'environnement hostile imposé par leur hôte, afin d'être capable d'y survivre. En fonction de leur évolution, les bactéries pathogènes se distinguent suivant le lieu de l'établissement de leur prolifération, qui peut se faire dans un milieu intracellulaire ou dans un milieu extracellulaire, et ce, soit obligatoirement, soit facultativement. En ce qui concerne les bactéries intracellulaires, celles-ci ont sélectionné des mécanismes leur permettant de rentrer et de survivre à l'intérieur de leur hôte cellulaire. Il est évident qu'un tel mode de vie implique un certain nombre d'adaptations afin de permettre une réplication efficace. La bactérie se doit de pouvoir éviter la dégradation cellulaire, assurer sa croissance, par exemple par l'obtention de sources de carbone, mais également éviter le système immunitaire de la cellule hôte. Afin de permettre cela, les bactéries pathogènes peuvent par exemple s'échapper des phagosomes et se répliquer dans le cytosol, ou encore inhiber ou diminuer la maturation des phagosomes en lysosomes (Flannagan *et al.*, 2009; Ray *et al.*, 2009).

Fort heureusement pour la bactérie, celle-ci s'est armée afin de lui permettre l'invasion l'hôte pour s'y répliquer, et ce malgré les contraintes qu'il impose. Pour les bactéries à prolifération intracellulaire, la manipulation du trafic semble être nécessaire, cette tactique d'invasion est d'ailleurs utilisée par plusieurs bactéries pathogènes, comme c'est le cas pour *Legionella pneumophila*, (Isberg *et al.*, 2009), *Salmonella enterica* (Bakowski *et al.*, 2008) et *Brucella spp.* (Starr *et al.*, 2008).

En ce concerne *Salmonella enterica*, un pathogène infectant une large variété de mammifères, causant des gastroentérites chez l'homme (Bakowski *et al.*, 2008), sa virulence est dépendante de sa capacité à envahir les cellules non-phagocytaires de son hôte. Dans ces cellules, la bactérie va survivre et proliférer dans des phagosomes modifiés, appelés SCV (*Salmonella* Containing Vacuoles). L'invasion et la réplication de *Salmonella enterica*, sont réalisées grâce à ses deux systèmes de sécrétion de type III (T3SS). Le premier T3SS (T3SS-1) va, dans un premier temps, permettre la sécrétion d'un premier ensemble de protéines qui vont activer des protéines de la famille des Rho GTPases, induisant des réarrangements d'actine et conduisant à l'internalisation de la bactérie par la cellule hôte. Ensuite, lors de son trafic et grâce au second T3SS (T3SS-2), la SCV va bloquer l'interaction avec les lysosomes et va également induire la formation de filaments (Sifs, pour *Salmonella*-Induced Filaments), dont la fonction reste encore inconnue (Steele-Mortimer, 2008).

*L. pneumophila*, une bactérie Gram négative intracellulaire facultative, proliférant dans les macrophages alvéolaires, représente l'agent pathogène de la maladie du Légionnaire causant des pneumonies chez l'homme. Une fois internalisée dans la cellule, *L. pneumophila* réside dans des LCV (*Legionella* Containing Vacuole) et ne suit pas le trafic vésiculaire normal conduisant aux lysosomes. Dans le macrophage, *L. pneumophila* va assurer sa réplication dans des vacuoles dérivées du Réticulum Endoplasmique (RE). La formation de ces compartiments est dépendante du système de sécrétion de type IV de la bactérie, appelé Dot/Icm. Lors du trafic de *L. pneumophila*, les LCV fusionnent avec des vésicules dérivées du RE pour former des vacuoles répliquatives, où les bactéries prolifèrent intensivement, causant la lyse de la cellule hôte et permettant l'invasion des macrophages voisins (Isberg *et al.*, 2009).

La bactérie qui va nous intéresser est *Brucella abortus*, une bactérie Gram négative intracellulaire facultative du genre *Brucella*. L'agent pathogène de la brucellose, une zoonose mondiale infectant un grand nombre de mammifère incluant l'homme dont, la virulence est reliée à sa capacité à se répliquer dans différents types cellulaires, tels que les macrophages et les cellules épithéliales (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998). Dans un premier temps, *B. abortus* doit donc rentrer dans la cellule afin de s'y répliquer, cette internalisation est médiée par une interaction avec les radeaux lipidiques (lipids rafts) (Celli, 2006). Dès que *B. abortus* se trouve dans la cellule, elle réside dans des vacuoles appelées BCV pour *Brucella* Containing Vacuoles. Dans la cellule, la BCV va interagir avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et même, de façon limitée et contrôlée, avec les lysosomes (Figure 1)(Starr *et al.*, 2008). Ensuite, la BCV va s'associer au RE, probablement par l'intermédiaire des « sites de sorties » (Endoplasmic Reticulum Exit Sites, ERES). Cette association va permettre à la bactérie de bénéficier de la dynamique membranaire de ces domaines pour fusionner avec le RE (Celli *et al.*, 2005). Ceci va contribuer à la mise en place d'une organelle dérivée du RE permissive à la réplication de *B. abortus* (Celli *et al.*, 2003). Une telle manipulation du trafic vésiculaire intracellulaire par la bactérie, nécessite un certain nombre de mécanismes moléculaires et cellulaires, permettant d'éviter une dégradation dans les lysosomes. Dans ce genre de sabotage cellulaire, la bactérie pathogène intracellulaire va sécréter des protéines (cfr. point suivant) permettant l'interaction avec des protéines centrales du trafic intracellulaire, telles que les Rab GTPases (Box1 pour plus de détails sur les protéines Rab)(Brumell and Scidmore, 2007; Pierini *et al.*, 2009). Ces protéines, membres de la famille des Ras GTPases, sont essentielles à la coordination des étapes du transport vésiculaire, telle que la formation de vésicules, leur mobilité, ainsi que leur fusion avec une organelle cible (Zerial and McBride, 2001). C'est grâce à la composition en membrane des protéines Rab et aux effecteurs qu'elles recrutent que le ciblage et la fusion des vésicules sont permis (Stenmark, 2009). Afin de permettre un contrôle et un sabotage du trafic intracellulaire de leur phagosome, les bactéries pathogènes intracellulaires vont exclure ou retenir un certain nombre de protéines Rab en membrane de leur phagosome. Cette stratégie de contrôle des protéines Rab est d'ailleurs adoptée plusieurs bactéries pathogènes, telle que *L. pneumophila* (Machner and Isberg, 2006). La présence de ces protéines Rab a été étudiée dans le cas des BCV. Il a été montré que Rab5, un marqueur de l'endosome précoce, était recruté en membrane des BCV pour ensuite être remplacé par Rab7, un marqueur de l'endosome tardif et du lysosome (Starr *et al.*, 2008).

Pour permettre aux bactéries de cibler et de contrôler les protéines centrales telles que sont les Rab GTPases, la bactérie sécrète des protéines appelées « effecteurs bactériens ».

### **1.1.1. Les effecteurs bactériens (Bhavsar *et al.*, 2007; Galan, 2009)**

Afin de contrôler la cellule hôte, la bactérie utilise une série de protéines, les effecteurs bactériens, qui vont interagir avec l'hôte et qui vont permettre une modulation des voies centrales de la cellule hôte contribuant au maintien de son état cellulaire normal, tel que le système vésiculaire du trafic intracellulaire. Ces protéines effectrices sont en fait des protéines bactériennes importantes pour la virulence du pathogène. Celles-ci vont être délivrées dans la cellule hôte grâce à des systèmes de sécrétion spécialisés. Une fois dans la cellule, ces protéines vont avoir un effet modulateur sur la cellule hôte dans le but de permettre l'invasion de la bactérie, sa survie et l'établissement de sa niche répliative. Ces

protéines peuvent par exemple interagir avec les Rab GTPase, afin de contrôler leur exclusion et/ou leur séquestration en membrane du phagosome contenant le pathogène, afin de modifier son trafic intracellulaire (Brumell and Scidmore, 2007; Pierini *et al.*, 2009).

L'action d'effecteurs bactériens sur un mécanisme eucaryotique peut non seulement se faire grâce à différents effecteurs, mais ces derniers peuvent également cibler le mécanisme en différents points, et ce afin de permettre un recouvrement optimal des fonctions cellulaires. Cette synergie d'effecteurs est d'ailleurs retrouvée chez *L. pneumophila*, où SidM et LidA vont agir de concert. En effet, SidM va permettre le recrutement de Rab1 sous forme liée au GTP et LidA va ensuite séquestrer Rab1 sur la membrane des LCV (Isberg *et al.*, 2009).

De plus, ces effecteurs, agissant sur des pathways bien définis de la cellule hôte, sont sécrétés par le pathogène à des moments bien précis. Comme exposé précédemment, *Salmonella* exprime deux systèmes de T3SS à des moments différents, permettant la sécrétion de deux ensembles d'effecteurs distincts. Ces deux T3SS de fonctions différentes sont donc exprimés à différents temps de l'invasion ; le T3SS-1 est requis pour l'invasion des cellules non-phagocytaires, alors que le T3SS-2 est impliqué dans la survie intracellulaire et l'établissement des SCV dans ces cellules (Steele-Mortimer, 2008).

La sécrétion de telles protéines nécessite la sélection de systèmes de sécrétion spécialisés, afin de permettre une sécrétion spécifique et régulée au cours de l'infection.

### 1.1.2. Les systèmes de sécrétion bactériens

La sécrétion de protéines à l'extérieur des bactéries impose des contraintes qui sont fonction du type de bactérie, Gram négative ou Gram positive. En effet, dans le cas de bactéries Gram positives, le transport de polypeptides au travers de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire conduit à la sécrétion dans le milieu extracellulaire. Tandis qu'en ce qui concerne les Gram négatives, ce transport résultera en une translocation dans le périplasme (Lee and Schneewind, 2001). Ainsi, les bactéries Gram négatives ont évolué afin de pallier à ces difficultés supplémentaires imposées par la structure de leur enveloppe. Différentes voies de sécrétion existent (Figure 2), telles que les systèmes de sécrétion de type I (T1SS)(Holland *et al.*, 2005), T3SS, (Cornelis, 2006) et le système de sécrétion de type IV (T4SS)(Christie *et al.*, 2005), permettent d'exporter les protéines à travers la membrane interne et externe, le plus souvent en une seule étape. D'autres moyens de sécrétion, comme le système de sécrétion de type II (T2SS), utilisent deux étapes. Premièrement une translocation dans le périplasme en utilisant soit le système Sec (de Keyzer *et al.*, 2003; Driessen and Nouwen, 2008) soit le système Tat (Robinson and Bolhuis, 2004). Deuxièmement une sécrétion au travers de la membrane externe (Filloux, 2004). Une autre possibilité pour les protéines périsplasmiques, est de se faire transporter par des vésicules dérivées de la membrane externe, les OMV (Outer Membrane Vesicles)(Kuehn and Kesty, 2005).

Toutes les bactéries Gram négatives ne sont pas en possession de toutes ces voies de sécrétions. De plus, d'autres voies existent, auxquelles il faut rajouter celles qu'on ne connaît pas encore. En ce qui concerne les bactéries du genre *Brucella*, celles-ci possèdent un T4SS (VirB) (O'Callaghan *et al.*, 1999), un flagelle (Fretin *et al.*, 2005), et la capacité de former des OMV (Gamazo and Moriyon, 1987).



#### 1.1.2.1. Le système de sécrétion de type IV (Christie *et al.*, 2005; Fronzes *et al.*, 2009a)

Le T4SS (VirB) de *Brucella spp.*, (O'Callaghan *et al.*, 1999) est homologue à la machinerie de sécrétion de *Agrobacterium tumefaciens*, permettant de transférer l'ADN-T dans la plante. Il existe différents types de T4SS, avec des fonctions différentes et regroupés en trois catégories ayant comme point commun d'être composés d'une famille de complexes multiprotéiques capables de sécréter des macromolécules.

Les trois catégories des membres de la famille des T4SS sont (Figure 3):

- ❖ Les systèmes de conjugaison permettant de transférer de l'ADN vers une cellule réceptrice cible ;
- ❖ Les systèmes de transport d'effecteurs permettant l'exportation de protéines effectrices, par le pathogène, dans les cellules eucaryotes hôtes durant l'infection. Ainsi les T4SS sont impliqués dans la virulence des bactéries pathogènes, telles que comme *Helicobacter pylori* (Cag), *L. pneumophila* (Dot/Icm), *Brucella spp.* (VirB) ;
- ❖ Les systèmes permettant l'échange d'ADN avec le milieu extracellulaire.

Le système VirB de *Brucella spp.*, fait donc partie de la catégorie des T4SS spécialisés dans la sécrétion de protéines effectrices. Ce système forme un complexe multiprotéique traversant l'enveloppe bactérienne (Figure 4)(Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Fronzes *et al.*, 2009b), et qui, dans le cas de *Brucella spp.*, est constitué de 12 protéines (de VirB1 à VirB12), celles-ci sont « séparées » en trois groupes. Premièrement le pilus, à la surface de la bactérie (VirB2 et VirB5), deuxièmement le pore, traversant les deux membranes (VirB3 et de VirB6 à VirB10) et troisièmement les deux ATPases de la membrane interne, qui vont fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement du complexe (VirB4 et VirB11). Dans le cadre de *Brucella spp.*, le T4SS contient une protéine additionnelle, VirB12 qui pourrait avoir un rôle dans l'interaction entre cellules, comme durant un évènement de conjugaison, par exemple (Sun *et al.*, 2005).

L'énergie investie dans de tels mécanismes de sécrétion, impose que la sécrétion des protéines sécrétées soit spécifique. Dès lors la question de savoir quel est le système de reconnaissance des protéines à sécréter apparaît comme essentielle. Dans le complexe VirB de *Agrobacterium tumefaciens*, c'est VirD4 qui est le premier en contact avec le substrat. Son rôle est de réceptionner le substrat à l'entrée (cytoplasme bactérien) du système de sécrétion. Cette protéine et ses analogues sont appelées protéines de couplage et permettent une reconnaissance du substrat. De plus, il semblerait que la sécrétion par le T4SS nécessite la présence d'une séquence signal en C-terminal de la protéine destinée à être sécrétée, premièrement mis en évidence chez *A. tumefaciens* (Vergunst *et al.*, 2000; Vergunst *et al.*, 2005). Cette séquence fut mise en évidence par la suite chez d'autres organismes, tels que *L. pneumophila* (Nagai *et al.*, 2005). Néanmoins certains T4SS, comme celui de *Brucella spp.*, peuvent utiliser une sécrétion indépendante de ses protéines de couplages. Dans ce cas-ci, les protéines peuvent être dans un premier temps transloquées dans le périplasme, pour ensuite être engagées dans le T4SS.

Chez *Brucella spp.*, le système VirB s'est révélé important pour la virulence et plus particulièrement pour la mise en place de la niche répliquative de la bactérie (Celli *et al.*, 2003; Delrue *et al.*, 2001). En effet, si l'on délète *Brucella spp.* pour l'opéron *virB*, qui code donc pour son T4SS, celle-ci ne parvient pas à survivre et à se répliquer (Delrue *et al.*, 2001; O'Callaghan *et al.*, 1999).

Récemment la sécrétion VirB-dépendante de deux protéines, VceC et VceA, a été montrée chez *B. abortus* et *Brucella suis* en contexte d'infection de macrophages. Ces protéines portent des séquences C-terminales qui suggèrent la présence d'un signal de sécrétion du T4SS (de Jong *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.2. Les OMV (Kuehn and Kesty, 2005)

Des études récentes rapportent la formation de vésicules dérivées de la membrane externe des bactéries, appelées OMV (ou « blebs »), et sont décrites comme importantes pour les interactions bactéries-bactéries mais aussi bactéries-cellules eucaryotes. Ces OMV apparaissent de plus comme étant un mécanisme permettant à la bactérie de « sécréter » un large et complexe groupe de protéines et de lipides dans le milieu extracellulaire. Des analyses biochimiques et protéomiques ont montré que les OMV étaient majoritairement composées de lipopolysaccharides (LPS), de phospholipides et de protéines originaires de la membrane externe ou du périplasme. D'autres composés comme l'ADN, des fragments de peptidoglycane ou autres protéines cytoplasmiques peuvent aussi être associés avec ces vésicules (Lee *et al.*, 2007).

La production de ces OMV (voir la Figure 5 pour plus de détails) est retrouvée à la fois chez les Gram négatives non-pathogéniques et chez les espèces pathogènes, *Brucella melitensis* (Gamazo and Moriyon, 1987) et *L. pneumophila* (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006). Par ailleurs, la composition des OMV semble changer en fonction du statut physiologique et du contexte environnemental de la bactérie (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006; Kuehn and Kesty, 2005). Il a été montré que ces OMV produites pouvaient entre autres délivrer des toxines dans la cellule hôte (Balsalobre *et al.*, 2006) et également inhiber la fusion phagosome-lysosome en macrophages (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006). Ainsi, les bactéries pathogènes utiliseraient ce procédé, de production vésiculaire, pour disséminer des facteurs de virulence et permettre leur survie et leur prolifération dans leur hôte.

Outre leur implication dans la virulence, les OMV contribuent également à la survie de la bactérie, en permettant par exemple de réduire le niveau de composés toxiques tel que le toluène (Kobayashi *et al.*, 2000). Il a aussi été montré que ces vésicules peuvent contenir de l'ADN plasmidique ou encore chromosomique. Dans certaines conditions ces vésicules pouvaient être utilisés afin de transformer les bactéries voisines, permettant des échanges de matériel bénéfique, tel que la résistance à des antibiotiques, entre bactéries, contribuant à leur diversité génétique (Yaron *et al.*, 2000). De plus certaines bactéries, telle que *E. coli*, utilisent ces vésicules pour acquérir un avantage face aux autres bactéries en leur délivrant des vésicules contenant des protéines telle que l'autolysine muréine hydrolase, pouvant lyser les autres bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Li *et al.*, 1998).

### 1.1.2.3. Le flagelle (Journet *et al.*, 2005; Macnab, 2004)

Le flagelle bactérien est une organelle permettant à la cellule de se propulser, ce mécanisme nécessite bien entendu de l'énergie qui est fournie par la force proto-motrice ou encore par la force sodium-motrice. *Brucella spp.*, semble être un organisme non-mobile, et pourtant il a été montré qu'il possède un flagelle (Abdallah *et al.*, 2003; Fretin *et al.*, 2005).

Le flagelle est constitué de plusieurs éléments majeurs, composant un remarquable complexe multiprotéiques (Figure 6). Ce système de mobilité est fortement associé au T3SS, ils sont en effet évolutivement liés et montrent une similarité de structure au niveau basal. Néanmoins, le flagelle est plus complexe que le T3SS car il inclut un moteur rotationnel qui est absent chez le T3SS (Cornelis, 2006). Dans le but de permettre l'exportation de ses composés extracellulaires, le flagelle possède une capacité d'exportation. Ce processus d'exportation est utilisé plusieurs fois lors de la morphogénèse du flagelle, auquel s'ajoute également le système Sec. En ce qui concerne le signal de reconnaissance des protéines exportées, contrairement au T4SS, il se fait par l'intermédiaire d'un signal N-terminal (Vonderviszt *et al.*, 1992).

Ainsi, le flagelle contient un mécanisme d'exportation lui permettant l'exportation séquentielle des composants du crochet et du filament. Néanmoins dans certains cas, l'exportation de composés non-flagellaires est possible. Chez *Salmonella enterica Typhimurium*, dans certaines circonstances, SptP et SopE sont sécrétées à travers le flagelle plutôt que par le T3SS (Lee and Galan, 2004). Chez *Bacillus thuringiensis*, le flagelle a été montré capable de sécréter l'hémolysine BL et la phosphatidylcholine phospholipase C (Ghelardi *et al.*, 2002). Ces données supportent la relation entre le flagelle et le T3SS qui, dans un premier temps, avait été montré par homologies de séquences, et plus tard, par similarités structurales. Pourtant, le flagelle n'est pas considéré comme étant un système de sécrétion en temps que tel, mais ces dernières données permettent de semer le doute quant à la fonction du flagelle chez *Brucella*, lorsque l'on sait que cette fonction ne semble pas être la mobilité (Fretin *et al.*, 2005).

La façon dont *Brucella spp.* met à profit ces différents systèmes potentiels n'est pas encore très claire. Pourtant, en vue de la nécessité de son T4SS, nous pouvons aisément postuler que l'établissement des BCV dans une organelle, dérivée du RE et permissive à sa réplication, n'est possible que par la sécrétion T4SS-dépendante, de protéines effectrices qui permettraient une modulation du trafic vésiculaire eucaryote. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune protéine sécrétée avec une activité effectrice décrite n'est connue chez *Brucella spp.*

## 1.2. Recherche d'effecteurs bactériens

L'importance des protéines effectrices dans les relations hôte-pathogène, ainsi que le défi que représente leur recherche, a stimulé de nombreuses études à leur sujet. De plus, la caractérisation de ces protéines, délivrées par des mécanismes de sécrétion, a permis non seulement de comprendre des aspects moléculaires fondamentaux des interactions hôte-pathogène, mais également d'améliorer la connaissance de processus cellulaires eucaryotes (Galan, 2009) (pour une revue).

Différentes stratégies ont été mises en place afin d'identifier ces protéines et également afin de les caractériser, dans le but de confirmer leur interaction avec l'hôte et leur importance dans la virulence du pathogène. Ci-dessous, nous allons parcourir une liste non-exhaustive de ces stratégies, et bien qu'il existe un grand nombre de combinaisons de ces dernières, cet aperçu nous permettra d'entrevoir les principales approches permettant l'étude de protéines effectrices bactériennes.

### **1.2.1. Construction de banques de mutants ciblés ou aléatoires**

Dans le cadre de l'étude des effecteurs bactériens, la création de mutants est une approche courante. La mutagenèse peut être faite de manière ciblée sur un gène, ou de manière plus générale, et plus aléatoire, sur l'entièreté d'un génome. Dans le cas d'un gène cible, la technique de mutagenèse par *error prone PCR* peut être utilisée, permettant de générer une série de mutants pour un gène donné, dans le but par exemple, de déterminer les zones de la protéine effectrice importante à l'interaction avec sa cible eucaryote (Nkengfac, non-publié). La création d'un mutant de délétion pour un gène cible, peut également se faire dans le simple but d'essayer de comprendre son implication dans l'infection cellulaire (Jamet *et al.*, non-publié). D'un autre côté, dans le cas d'une mutagenèse aléatoire à l'échelle du génome, la banque de mutants peut être utilisée pour rechercher des effecteurs bactériens en utilisant un crible approprié. Ce crible sera fonction en grande partie de la technique de mutagenèse utilisée et peut, par exemple, être fait en contexte d'infection afin de mettre en évidence une perte de la virulence due à la mutation. Afin de réaliser des banques de mutant à l'échelle du génome, les transposons sont de bons outils, couramment utilisés, ils sont décrits dans le point suivant.

### **1.2.2. Les transposons (Choi and Kim, 2009; Reznikoff, 1993)**

Les transposons sont des éléments génétiques mobiles, qui se meuvent par transposition. Il en existe de deux types : le premier est la transposition conservatrice, lors de laquelle il y a transfert du transposon d'un site donneur vers un site accepteur. Le second est la transposition répllicative durant laquelle l'élément transposable est copié d'un site à un autre, tout en restant au site donneur. La transposition ne nécessite pas de séquence homologue entre les sites donneurs et accepteurs, contrairement aux événements de recombinaison classique, l'insertion du transposon se fait alors de manière aléatoire dans le génome ciblé, ce qui peut provoquer la disruption d'un gène et donc permet la création de mutants. C'est pour cette raison que les transposons sont souvent utilisés dans le but de créer des banques de mutants aléatoires à l'échelle du génome. Pour ce faire, il existe différents transposons utilisables tels que les transposons Tn10 ou Tn5, qui utilisent la transposition conservative et qui vont permettre de disrupter des gènes tout en les marquant par leur présence, rendant facile l'identification des gènes disruptés.

Bien que les transposons furent beaucoup utilisés afin de déterminer quels étaient les gènes essentiels à la croissance (Scholle and Gerdes, 2008), ou encore à la virulence (Lestrade *et al.*, 2000; Lestrade *et al.*, 2003). La génération de mutants par utilisation des transposons peut également servir dans un crible de recherche d'effecteurs. Dans le cas de la découverte de LidA (pour Lowered viability In the presence of Dot A) par exemple, le transposon Tn10 fut utilisé pour générer une banque de mutants afin de les utiliser dans un crible. Se basant sur le fait que des molécules effectrices sécrétées pouvaient réguler la fonction d'un système de

sécrétion et que la mutation de ces protéines pouvait résulter en une dérégulation toxique du système de sécrétion, un crible fut mis en place. Il avait pour principe de sélectionner les mutants qui avaient une faible capacité à pousser en présence d'un système Dot/Icm intact, mais une viabilité normale si la mise en place de Dot/Icm était empêché par un mutant *dotA*<sup>-</sup> (Conover *et al.*, 2003). Il existe également des formes dérivées du Tn5 (de Lorenzo *et al.*, 1990) et qui permettent par exemple de créer des fusions aléatoires. Ce genre de transposons permit par exemple de montrer la sécrétion de nouveaux effecteurs chez *S. enterica*. Ce test consistait à créer des fusions aléatoires de gène de *S. enterica* avec CyaA', ce qui permettait ensuite l'utilisation de ces fusions dans un test de sécrétion (Geddes *et al.*, 2005).

### 1.2.3. La levure au service de la science (Curak *et al.*, 2009; Siggers and Lesser, 2008)

A l'heure actuelle, la levure est connue de tous, que cela soit dans un cadre scientifique ou autre, néanmoins peu se doutent de son utilité. Il y a en effet beaucoup d'avantages à travailler avec *Saccharomyces cerevisiae*, que cela soit des facilités de manipulation, de culture, ou encore d'analyse génétique. De plus, celle-ci a été utilisée pour étudier des procédés fondamentaux de la cellule eucaryote et ce depuis plus de 50 ans. Si l'on en revient à notre recherche de protéines bactériennes effectrices, le fait que de nombreux processus cellulaires, tels que le cytosquelette d'actine ou le trafic vésiculaire, soit relativement conservés entre la levure et les cellules eucaryotes supérieures, suggère que la levure puisse être utilisée comme outil, afin d'étudier les protéines effectrices, plutôt que de les étudier dans un contexte d'infection.

De plus, diverses études ont renforcé cette suggestion. Il a par exemple, été montré que la localisation subcellulaire de différentes protéines effectrices de *Yersinia* (YopE, YopH, YopM et YpkA), précédemment identifiées en cellules eucaryotes, était similaire à celle observée en levure. Cette similarité de localisation était observée même dans des cas tels que le ciblage du noyau, montrant l'utilisation de voies conservées entre la levure et les cellules eucaryotes. En utilisant des mutants dans un test de croissance, ils ont également pu montrer que l'effet de YopE était lié à une activité RhoGAP de cet effecteur, montrant ainsi que la levure peut être utilisée afin de déterminer l'activité protéique causant le phénotype imposé à la levure (Lesser and Miller, 2001).

Les nombreuses possibilités qu'apporte la levure, ainsi que le challenge qu'est la recherche d'effecteurs, a permis l'émergence de nombreuses approches expérimentales dans ce domaine, dont voici ci-dessous un bref aperçu.

#### 1.2.3.1. La levure et sa croissance comme rapporteur de la présence d'effecteur

Dans le cadre de la recherche d'effecteurs, il existe des tests faciles, tel que le test d'inhibition de la croissance de la levure, qui permettent la découverte ou la validation de protéines effectrices. En effet, il apparaît de plus en plus évident que l'inhibition de la croissance des levures due à la production de protéines bactériennes, dit aussi test de croissance, s'avère être un outil sensible et spécifique indiquant une activité effectrice (Siggers and Lesser, 2008). Le test de croissance consiste à exprimer le gène de notre protéine d'intérêt en levure, et ce sous le contrôle d'un promoteur, tels que *GALI* ou *GALI0*, permettant un système inductible par la source de carbone du milieu de culture. Par une

approche consistant en une recherche de la perte de croissance de la levure, due à la présence d'une protéine bactérienne, différents cribles ont permis de trouver de nouveaux effecteurs (Curak *et al.*, 2009). En effet, chez *S. enterica* (Lesser and Miller, 2001; Rodriguez-Pachon *et al.*, 2002) et chez *L. pneumophila* (Campodonico *et al.*, 2005; Derre and Isberg, 2005), différents effecteurs ont pu être mis en évidence par ce procédé.

#### 1.2.3.2. La levure comme système pour identifier les protéines qui perturbent le trafic vésiculaire

Comme évoqué précédemment, la modification du trafic vésiculaire intracellulaire est une stratégie souvent adoptée par le pathogène intracellulaire, et de façon intéressante le trafic vésiculaire eucaryote est relativement homologue entre la levure et les cellules mammaliennes. Ceci permet l'élaboration de tests montrant l'effet de protéines bactériennes sur le trafic vésiculaire de la levure. Parmi ces tests permettant de montrer le caractère perturbateur de protéines effectrices sur trafic vésiculaire en levure, PEPSY (Pathogen Effector Protein Screening in Yeast) (Curak *et al.*, 2009; Shohdy *et al.*, 2005), est un test qui utilise une protéine hybride résultant de la fusion entre une invertase (Inv) et la carboxypeptidase Y (CPY), une hydrolase vacuolaire. Cette protéine hybride, Inv-CPY, possède deux caractéristiques essentielles. Premièrement dans des conditions normales de trafic vésiculaire, elle sera séquestrée dans la vacuole de la levure. Deuxièmement, grâce à l'activité de l'invertase, elle est capable de dégrader le sucrose disponible. Dans le cadre de la recherche d'effecteurs, elle est utilisée comme témoin d'un trafic vésiculaire défectueux. En effet, si la présence d'une protéine bactérienne dans la levure cause un défaut dans le trafic en levure, le désordre résultant va conduire à une sécrétion des vésicules contenant la protéine hybride CPY-Inv, qui va alors se retrouver en surface de la levure, et provoquer la dégradation du sucrose contenu dans le milieu. Cette dégradation conduit à une coloration brune de la colonie sur la boîte de Pétri, ce qui pourra facilement être visible lors d'un crible. Ce test permet d'ailleurs de mettre en évidence 3 protéines de *L. pneumophila* interférant avec le trafic de la levure : VipA, VipD, VipF (Shohdy *et al.*, 2005).

L'effet d'une protéine bactérienne sur le trafic vésiculaire de la levure peut également être mis en évidence par l'analyse de protéines rapportrices, telles que l'alkaline phosphatase (ALP) et la CPY (Heidtman *et al.*, 2009; Shohdy *et al.*, 2005). Ces deux protéines trafiquent du RE vers la vacuole de la levure et subissent des modifications post-traductionnelles lors de ce trafic (Klionsky and Emr, 1989; Kucharczyk and Rytka, 2001). Ces modifications post-traductionnelles conduisent à des changements du poids moléculaire de l'ALP et de la CPY (Figure 7A), changements qui peuvent être analysés par western blot (Figure 7B). Donc, si la production en levure d'une protéine bactérienne cause un défaut dans le trafic de la levure, ceci peut conduire à une perturbation du trafic des protéines rapportrices et à une accumulation des précurseurs de l'ALP et de la CPY, ce qui pourra être détecté par western blot (Figures 7B et C). Ce test, déjà utilisé chez *L. pneumophila*, permet de montrer l'effet de plusieurs protéines bactériennes sur le trafic vésiculaire de la levure (Heidtman *et al.*, 2009).

Néanmoins, montrer l'effet d'une protéine bactérienne sur la cellule eucaryote n'a pas de relevance biologique si la protéine bactérienne en question n'est pas sécrétée par la bactérie. C'est pourquoi, l'étude de la sécrétion de ces protéines est également un point important.

#### ***1.2.4. Être sécrété, la première caractéristique d'un effecteur***

Afin de montrer la pertinence d'un effet d'une protéine bactérienne sur l'intégrité d'une cellule eucaryote, des tests de sécrétions peuvent être effectués. Il en existe de deux types : soit dans un contexte de sécrétion *in vitro* soit dans un contexte d'infection cellulaire.

##### **1.2.4.1. Test de sécrétion *in vitro***

Dans le cadre de l'étude de protéines effectrices, montrer la sécrétion de la protéine d'intérêt est donc une caractéristique importante, et peut être fait dans un contexte *in vitro* (culture bactérienne). Cette approche *in vitro*, ne demandant pas l'utilisation de cellules eucaryotes, permet une investigation à plus grande échelle qui peut être mise au point aisément.

De façon pratique, le test de sécrétion *in vitro* consiste à cultiver la bactérie et ensuite à analyser le milieu de croissance (surnageant de culture), afin de voir s'il contient des protéines sécrétées par la bactérie (Anderson *et al.*, 1999; 2007; Knodler *et al.*, 2003). Pour permettre l'analyse des protéines sécrétées, un épitope est ajouté à la protéine d'intérêt afin de permettre une détection par western blot, en utilisant des anticorps dirigés contre l'épitope ajouté aux protéines d'intérêts (Anderson *et al.*, 1999). Après culture, la méthode de centrifugation est utilisée, qui génère un culot contenant les bactéries, et un surnageant contenant le milieu de culture. Dans le test, les analyses en western blot sur le culot, servent à vérifier la production et la stabilité de la fusion protéique. Tandis que les analyses du surnageant permettent de montrer la présence de la fusion dans le milieu extracellulaire et donc de montrer sa sécrétion par la bactérie (Knodler *et al.*, 2003).

Il faut néanmoins rester prudent face aux données obtenues lors des tests de sécrétion *in vitro*. En effet, le milieu de culture diffère fortement du milieu dans lequel se trouvent les bactéries dans un contexte d'infection cellulaire. Ainsi, l'absence de sécrétion en contexte *in vitro* n'exclut pas une sécrétion *in vivo*. Le test de sécrétion *in vitro* apparaît donc comme une bonne approche de première ligne, mais nécessite d'être complété par un test en contexte d'infection.

##### **1.2.4.2. Test de sécrétion en contexte d'infection**

###### ***1.2.4.2.1. CyaA, une toxine bien utile (Ladant and Ullmann, 1999)***

L'Adenylate cyclase (CyaA) est une des principales toxines sécrétées par *Bordetella pertussis*. Cette enzyme connue depuis plus de 20 ans possède différentes caractéristiques utiles dans le cadre de la recherche d'effecteurs. En effet, celle-ci a une activité calmoduline (CaM) dépendante, elle n'est donc active qu'une fois sécrétée dans la cellule eucaryote où elle est activée par la CaM endogène et où elle catalyse la synthèse d'un grand nombre d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Cette caractéristique la rend utile dans le cadre de l'étude de la sécrétion de protéines bactériennes. En effet, l'utilisation des 400 premiers acides aminés de la toxine (CyaA'), dans lesquels se trouve le domaine catalytique de CyaA, couplé au fait que son activité est spécifique à l'environnement eucaryotique, nous donne un

outil enzymatique permettant de montrer la sécrétion de protéines bactériennes. Si l'on fusionne CyaA' à une protéine bactérienne d'intérêt, sa sécrétion peut être démontrée en mesurant l'accumulation d'AMPC. Car cette accumulation reflète l'action de la fusion dans la cellule eucaryote et donc reflète la sécrétion de cette fusion. Ce test, plusieurs fois retrouvé dans la littérature, permet de mettre en évidence des protéines sécrétées dans un contexte d'infection chez *Salmonella* (Geddes *et al.*, 2005) et *L. pneumophila* (Heidtman *et al.*, 2009; Shohdy *et al.*, 2005) mais peut également permettre de montrer les domaines requis pour la sécrétion (Sory *et al.*, 1995).

#### 1.2.4.2.2. Système Cre-Lox (Sauer, 1998)

Un autre moyen de montrer la sécrétion est l'utilisation du test CRAFT (Cre Reporter Assay For Translocation). Ce test utilise une recombinase Cre, cette recombinase site-spécifique va en fait reconnaître des sites de 34 pb, appelés *loxP*. Pour le test, une fusion de la recombinase Cre et des protéines d'intérêt est construite et produite dans la bactérie pathogène étudiée (Schrammeijer *et al.*, 2003; Vergunst *et al.*, 2000). Ce test fut, par exemple, utilisé dans différentes études pour caractériser la séquence signal du système de sécrétion de type IV d'*A. tumefaciens*, en condition d'infection d'*Arabidopsis thaliana*. Le principe est d'utiliser une souche d'*A. thaliana* (la lignée 3043, dans ce cas-ci), qui possède dans son génome une séquence d'ADN définie (bordées de sites *loxP* en répétition directe), qui en présence de recombinase sera excisée et permettra la reconstitution d'un système rapporteur (une résistance à la kanamycine dans ce cas-ci). Ainsi l'expression du système rapporteur n'est permise qu'en présence de recombinase Cre et donc seulement si il y a sécrétion de la protéine de fusion (Vergunst *et al.*, 2000; Vergunst *et al.*, 2003; Vergunst *et al.*, 2005).

#### 1.2.4.2.3. Test $\beta$ -lactamase

Pour montrer la sécrétion d'effecteurs bactériens en contexte d'infection cellulaire, l'utilisation de la  $\beta$ -lactamase, fusionnée à la protéine d'intérêt, semble également être un outil efficace (Charpentier and Oswald, 2004; de Jong *et al.*, 2008; Raffatellu *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007). En effet, si la fusion résultante est sécrétée dans la cellule infectée, l'activité  $\beta$ -lactamase pourra être détectée et démontrer la sécrétion de protéines potentiellement effectrices (Charpentier and Oswald, 2004). La détection de l'activité  $\beta$ -lactamase, très sensible, est basée sur sa réaction catalytique qui hydrolyse un substrat spécifique contenant un anneau  $\beta$ -lactame. Cette réaction qui représente un facteur de résistance important aux antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame (Gupta, 2007; Tenover, 2006) consiste en une attaque de la  $\beta$ -lactamase sur l'anneau  $\beta$ -lactame de son substrat et résulte en un produit à deux groupes acides, qui est stable et qui peut donc être détecté et analysé (Sykes and Matthew, 1976). Un substrat possible est la nitrocefine qui subit un changement de couleur, du jaune vers le rouge, en présence de  $\beta$ -lactamase. Ainsi ce changement de couleur, nous permet de détecter la présence d'activité  $\beta$ -lactamase et donc, nous permet d'analyser la présence ou non de notre fusion dans les échantillons analysés (Remy *et al.*, 2007). Un test semblable utilisant le CCF2/AM comme substrat fluorescent de la  $\beta$ -lactamase fut utilisé chez *B. abortus* et *B. suis* et permit de montrer la sécrétion de VceC et VceA dans les macrophages (de Jong *et al.*, 2008).



Comme on peut le constater, nombreux sont les tests existants qui permettent la découverte de protéines effectrices. Néanmoins comme dit précédemment les tests expliqués ci-dessus ne représentent pas une liste exhaustive, et il existe beaucoup de combinaisons possibles. Dans un premier temps, il est souvent question d'un crible visant à diminuer le nombre de candidats effecteurs potentiels. Au laboratoire une approche originale a été développée et commence par la recherche d'interactants en utilisant un crible double-hybride, cette approche intéressante est expliquée dans le point suivant.

### 1.3. Identification de RicA, un effecteur potentiel de *Brucella spp.*

Comme il a été mentionné précédemment, la modulation du trafic intracellulaire de la cellule hôte par une bactérie pathogène, dans le but d'établir sa niche de réplication, s'effectue grâce à l'action de protéines effectrices. Néanmoins, à l'heure actuelle aucune protéine de *Brucella spp.* avec une fonction effectrice n'est connue.

Lors de son trafic, *B. abortus* dévie donc le réseau vésiculaire normal de sa cellule hôte et ce *a priori*, par l'interaction d'effecteurs avec des protéines clés de ce réseau. Au laboratoire, afin de sélectionner des candidats effecteurs de *B. abortus* différents cribles double hybride ont été effectués. Un premier crible utilisant toutes les protéines prédites de *B. melitensis*, et dirigé contre les protéines phagosomales humaines, permet d'identifier l'interaction entre RicA, (Rab2 interacting conserved protein A) et Rab2 (Jamet *et al.*, unpublished).

RicA fut l'objet d'investigations plus poussées, notamment en ce qui concerne l'étude de son interaction avec Rab2. Rab2 étant une petite GTPase (Box1 pour détails sur Rab2), celle-ci peut être sous deux états conformationnels différents, imposés par son interaction avec un GTP ou un GDP. Dès lors, ce changement de conformation a-t-il un effet sur la capacité de RicA à interagir avec Rab2 ? Pour répondre à cette question, une fusion de RicA avec un épitope 3Flag fut testée dans un test GST pulldown. Ce test fut effectué en utilisant soit une fusion GST-Rab2 chargée en GDP, soit une fusion GST-Rab2 chargée en GTPγS, une forme non-hydrolysable du GTP. Ainsi, on pouvait déterminer si la fusion 3Flag-RicA interagissait mieux avec Rab2 sous forme GDP, ou sous forme GTP. Il semblerait, que la fusion liait de façon préférentielle la fusion GST-Rab2 lié à du GDP (Jamet, Laloux, Nkengfac, non-publié).

Une banque d'allèles mutants de *ricA* a été créée en utilisant la méthode de mutagenèse par PCR, et en utilisant la méthode du double-hybride pour sélectionner les mutants ayant toujours la capacité d'interagir avec Rab2, du moins dans le noyau de la levure (Nkengfac, non-publié). Cette capacité d'interaction suggère que le repliement de RicA, au moins dans les régions interagissant avec Rab2, reste relativement stable, dans ces conditions. Cette approche permet de proposer une zone d'interaction localisée à la surface de RicA, dans un modèle tridimensionnel construit par homologie.

Cependant, il faut bien garder à l'esprit que l'interaction entre RicA et Rab2 n'a pas de relevance biologique si RicA n'est pas sécrétée par *Brucella* dans la cellule hôte. En effet, si les protéines ne se retrouvent pas dans le même compartiment, il ne peut pas y avoir d'interaction. Un moyen de vérifier la pertinence de ces interactions est d'effectuer des tests de sécrétion, soit *in vitro*, soit en contexte d'infection cellulaire.

Ainsi, dans le cadre de l'étude de la protéine RicA, un test de sécrétion *in vitro* a été mis au point au laboratoire. Ce test consiste à fusionner notre protéine d'intérêt avec un épitope

3Flag, soit en C-terminal soit en N-terminal et après croissance sur un milieu défini, procéder à des analyses en western blot, utilisant des anticorps dirigés contre l'épitope Flag, sur le surnageant de culture concentré dans lequel se trouvent les protéines sécrétées. Ce test permet de montrer la sécrétion *in vitro* des fusions 3Flag-RicA et de RicA-3Flag. De plus, l'utilisation d'une souche de *Brucella* mutée pour l'opéron *virB*, codant pour le T4SS, permet de montrer que la sécrétion de RicA ne dépend pas du T4SS, du moins dans nos conditions d'expérimentation *in vitro*. Des analyses en western blot, utilisant des anticorps dirigés contre des composés des OMV, permirent de montrer l'absence des OMV dans les surnageants de culture concentrés, obtenus dans nos conditions d'expérimentation. La présence de RicA en absence des OMV suggère donc que la sécrétion de RicA serait indépendante des OMV. Le système de sécrétion de RicA demeure donc encore inconnu et mérite de plus amples investigations.

De plus, des différences ont été montrées entre les mutants  $\Delta ricA$  et la souche sauvage. En effet, le trafic intracellulaire de ces deux souches, en infection de cellules HeLa, a été étudié par microscopie confocale, LAMP1 comme marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes. Ainsi, lorsque l'on compare la souche  $\Delta ricA$  à la souche sauvage, une accélération de la perte de LAMP1 des BCV en cellules HeLa a été observée, et ce, de façon significative et reproductible (Salcedo, non-publié). Lors d'un test en contexte d'infection, utilisant les souches de *B. abortus* 2308  $\Delta ricA$ , ou sauvage, ou  $\Delta ricA$  contenant un plasmide de complément, le dénombrement des bactéries par cellule montra que la souche  $\Delta ricA$  prolifère de façon plus intense que la souche sauvage ainsi que la souche  $\Delta ricA$  complétée. L'accélération de la perte de LAMP1 ainsi que l'augmentation du nombre de bactéries par cellule pour la souche  $\Delta ricA$ , suggère que RicA aurait une influence sur la cinétique d'invasion cellulaire, et aurait tendance à diminuer la capacité de la bactérie à rejoindre sa vacuole de réplication.

D'un autre côté, il semblerait que Rab2 soit recrutée sur les BCV pendant l'infection et qu'il serait nécessaire à l'infection cellulaire par *B. abortus*. En effet, lorsqu'on exprime un dominant négatif de Rab2 dans la cellule que l'on infecte par *B. abortus*, le taux de réplication bactérienne diminue et la bactérie se retrouve bloquée dans des compartiments endosomiaux tardifs (Fugier *et al.*, 2009).

Ces données permettent de proposer qu'à l'heure actuelle RicA se dévoile comme étant une protéine intéressante et un bon candidat effecteur, ce qui mérite des investigations plus poussées. En effet, les résultats déjà obtenus sont encourageants, mais il reste encore beaucoup de questions sans réponse, comme par exemple savoir quel est le système de sécrétion utilisé par RicA, et quels sont les signaux portés par RicA et qui pourraient être impliqués dans la sécrétion par le système de sécrétion.

## 2. Objectifs

Ainsi, dans le but de tenter de répondre aux questions posées par RicA et son apparente implication dans l'invasion intracellulaire par *B. abortus*, mon mémoire se divise en deux parties, et a pour but d'augmenter et d'affiner nos connaissances sur sa sécrétion, ainsi que son effet possible sur la cellule eucaryote.

La première partie de mon mémoire consiste à tenter de comprendre comment RicA est sécrétée par *Brucella* et à commencer par essayer d'identifier des acides aminés impliqués dans sa sécrétion. Pour ce faire, le test de sécrétion *in vitro* mis au point au labo est un outil intéressant. Le but est de l'utiliser pour tester la sécrétion des 32 allèles de RicA, sélectionnés au laboratoire pour leur capacité d'interaction avec Rab2 (Nkengfac, non-publié). Si l'une ou l'autre RicA mutée ne parvenait pas à être sécrétée, cela pourrait nous aider à trouver les acides aminés impliqués dans sa sécrétion.

Néanmoins la sécrétion n'est pas la seule caractéristique d'une protéine effectrice, car un effet modulateur sur la cellule hôte est nécessaire pour permettre de désigner une protéine bactérienne comme étant effectrice. Nous proposons d'utiliser la levure, qui s'avère être un outil utile. En utilisant la CPY et l'ALP comme protéines reportrices, nous avons tenté de montrer un effet de RicA sur le trafic de la levure. Un test de croissance a également été utilisé pour montrer une influence de la production de RicA en levure sur la capacité de croissance de cette dernière.

# Résultats

### 3. Résultats

#### 3.1. Test de sécrétion *in vitro*

Dans le cadre de la caractérisation de RicA, le test de sécrétion *in vitro* a déjà permis de montrer la sécrétion de 3Flag-RicA et de RicA-3Flag par *Brucella abortus* 2308. De plus, l'utilisation d'un mutant  $\Delta virB$  a montré que cette sécrétion était VirB-indépendante. La question qui se pose alors est de savoir quel est le système de sécrétion utilisé par la bactérie pour permettre la sécrétion de RicA. Une autre question est de se demander quels sont les déterminants structuraux de RicA qui permettent sa sécrétion. Un moyen de répondre à cela est d'utiliser des mutants de RicA dans le test de sécrétion *in vitro* afin de voir quels mutants ne sont plus sécrétés.

Dans cette première partie, l'application du test de sécrétion *in vitro* aux 32 formes mutées de RicA, sélectionnées pour leur capacité à interagir avec Rab2 malgré leurs mutations, fut proposée comme approche expérimentale. Ce test a pour but de tenter de déterminer quels sont les acides aminés impliqués dans la sécrétion de RicA.

##### 3.1.1. Construction des souches

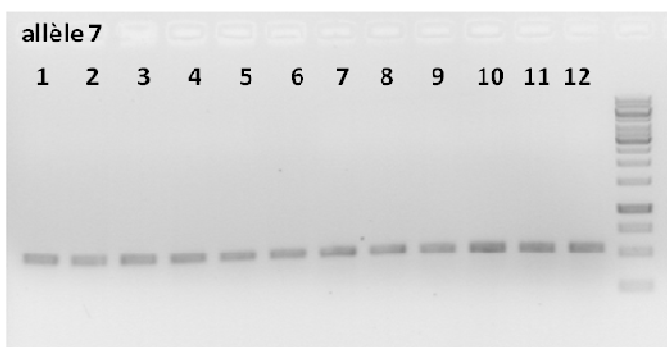
###### 3.1.1.1. Construction des plasmides

Afin de permettre la mise en place du test de sécrétion *in vitro*, un épitope a dû être ajouté aux différents allèles de *ricA* (*ricA\**). L'épitope 3Flag ayant été utilisé pour montrer la sécrétion de RicA par le test de sécrétion *in vitro*, il fut ajouté aux différents allèles étudiés. Dans le but de pouvoir construire un grand nombre de plasmides rapidement, la méthode de clonage par Gateway<sup>TM</sup> (GW) fut utilisée (Hartley *et al.*, 2000). De plus, bien que la sécrétion de 3Flag-RicA et de RicA-3Flag ait été démontrée par test de sécrétion *in vitro*, il semblerait que l'utilisation du pBBRMCS4-3Flag-RicA ne permette pas la production de fusions RicA-3Flag stables. L'épitope 3Flag fut de ce fait fusionné à l'extrémité N-terminale des différentes formes mutées de RicA (*ricA\**). Cette fusion résultera donc en la production de protéines de fusion 3Flag-RicA\*.

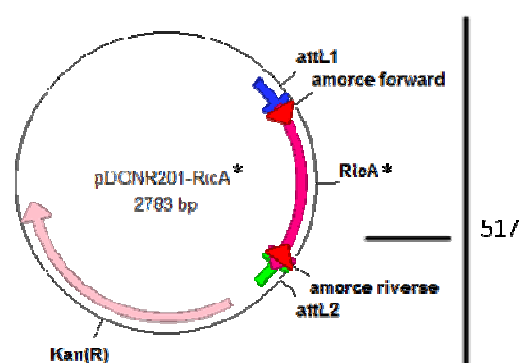
Pour commencer, une analyse bioinformatique permet de déterminer les mutations en acides aminés des différentes formes de RicA\* sur base des séquences nucléotidiques des différents allèles. Lors de cette analyse, il s'est avéré que les allèles 1 et 12 portaient des mutations nucléotidiques différentes, mais conduisant à la même séquence peptidique, et que les allèles 27 et 30 portaient des mutations silencieuses. Au départ des 32 allèles de *ricA\**, seuls 29 furent donc utilisés dans le but de procéder à un test de sécrétion *in vitro*.

L'ajout de l'épitope 3Flag aux différents allèles de *ricA\** fut donc permis grâce à la méthode de clonage par Gateway<sup>TM</sup>. Les différents plasmides utilisés dans cette méthode furent le pDONR201 comme vecteur donneur, et le pBBRMCS4-3Flag-GW précédemment construit pour montrer la sécrétion de 3Flag-RicA comme vecteur de destination. Comme expliqué dans le matériel et méthode, la première étape de la méthode Gateway<sup>TM</sup> consiste à amplifier les allèles par PCR en y ajoutant les sites *attB1* et *attB2* aux extrémités. Ces sites sont indispensables à la réaction de recombinaison effectuée par la BP clonase, permettant l'insertion des allèles dans le pDONR201.

### 1. PCR sur colonie d'une transformation isolée

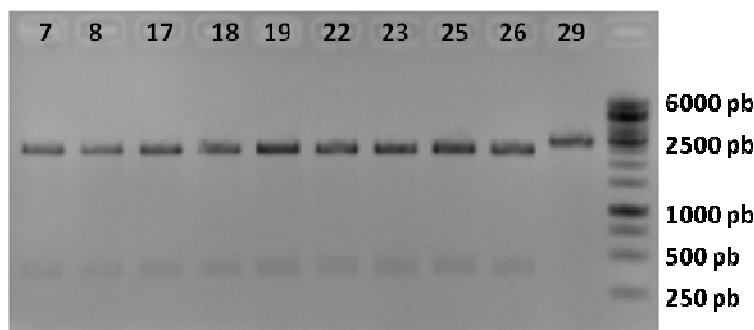


### Tailles attendues après PCR:

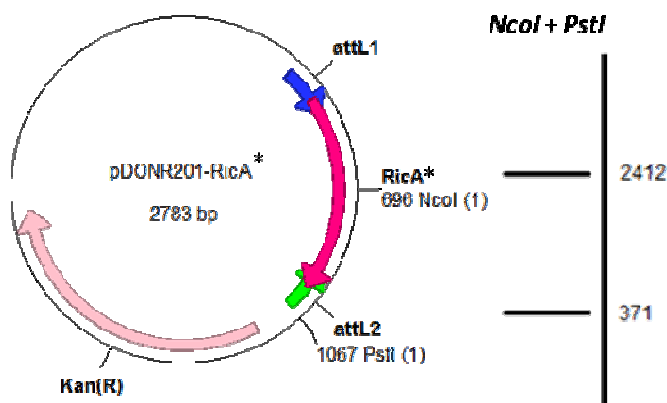


Mélange des clones issus de la même transformation

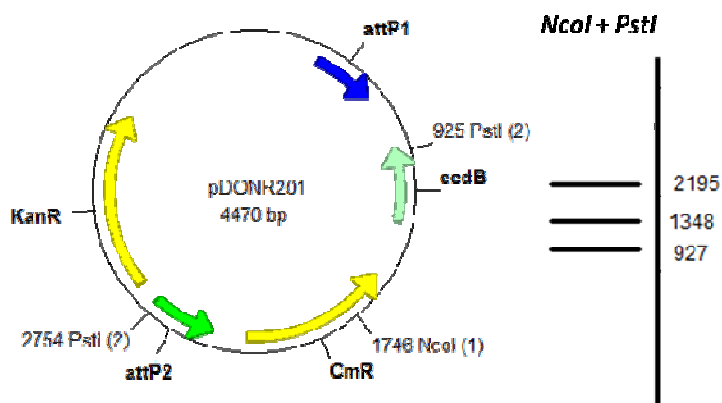
### 2. Restrictions diagnostiques



### Tailles attendues après restriction:



### Tailles attendues après restriction:



**Figure 8 : Vérification de l'insertion de *ricA\** dans le pDONR201.** Afin d'obtenir des souches d'*E. coli* portant les pDONR201-RicA\* des différents allèles, *E. coli* DH10B fut transformée avec les pDONR201 résultant de la réaction BP, pour ensuite être sélectionnée sur milieu sélectif contenant de la kanamycine. Des PCR sur colonie furent alors effectuées sur des clones d'une transformation isolée (dans ce cas-ci, 12 clones de la souche contenant le pDONR201-RicA\* portant l'allèle 7) afin de permettre la vérification de la présence des plasmides. Sur la figure, nous remarquons que tous les clones montrent une amplification à la taille attendue, indiquant que la réaction BP ainsi que la transformation de *E. coli* furent efficaces. Suite à cette vérification par PCR, tous les clones issus d'une même transformation (i.e. ici les souches *E. coli* contenant le plasmide pDONR201-RicA\* portant l'allèle 7, ou 8, ou 17, ou 18, ou 19, ou 22, ou 23, ou 25, ou 26, ou 29) furent alors mélangés, et chaque pool

fut vérifié séparément par restriction diagnostique. L'enzyme *NcoI*, coupant dans *ricA*\* ainsi que dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, et l'enzyme *PstI*, coupant dans le pDONR201 et dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, furent utilisés pour la restriction diagnostique. Comme nous pouvons le voir sur la figure, les tailles attendues après restriction ne sont pas les mêmes si le pDONR201 porte la cassette Gateway<sup>TM</sup>, ou s'il porte *ricA*\*. Grâce à cette différence, nous constatons que toutes les souches analysées dans ce cas portaient le pDONR201-RicA\*. Nous pouvons cependant remarquer que la souche portant l'allèle 29 ne montre pas le même profil de restriction, mais cela s'explique par le fait que la mutation de l'allèle 29 touche le site de restriction de *NcoI*.

Les plasmides ainsi obtenus sont alors utilisés afin de transformer une souche bactérienne sensible à *ccdB* (*E. coli* DH10B dans notre cas), permettant de sélectionner le remplacement de la cassette Gateway<sup>TM</sup> par la séquence d'intérêt. Cette souche est ensuite cultivée sur milieu contenant de la kanamycine afin de sélectionner l'obtention du plasmide. Ensuite, comme nous pouvons le voir sur la Figure 8, des PCR sur colonies sur des clones issus d'une même transformation ont été effectuées dans le but de vérifier l'insertion de *ricA* dans le pDONR201. Dans le cas où les clones analysés par PCR montraient une amplification à la taille de *ricA*\*, les clones résultant de la même série de transformations furent mélangés et ensuite les différents pools furent séparément vérifiés par restriction. Cette approche par pool, permettant d'éviter une vérification individuelle d'un grand nombre de clones isolés, nous fit gagner beaucoup de temps. Néanmoins, bien que l'approche Gateway<sup>TM</sup> permette un clonage facile et efficace, il est possible que les événements de recombinaison ne se fassent pas comme prévu, ce qui fut le cas pour les allèles 28 et 16. L'isolement de clones contenant le pDONR201-*ricA*\* portant ces deux allèles n'a donc pas été possible.

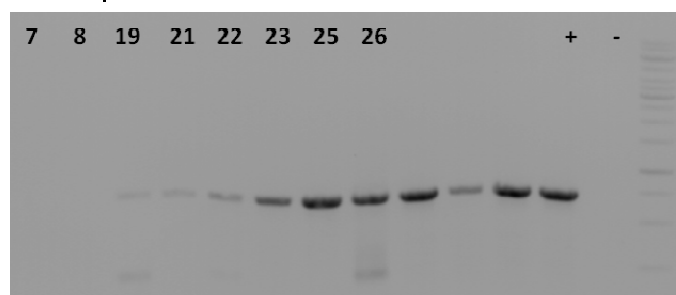
La troisième étape consiste à utiliser les plasmides obtenus lors de la réaction BP, pour procéder à la réaction LR afin d'insérer les différents allèles de *ricA*\* dans le vecteur de destination, le pBBRMCS4-3Flag-GW. Le mélange issu de la réaction LR fut transformé dans *E. coli* DH10B, la sélection des transformants s'est déroulée en présence d'ampicilline. Comme nous pouvons le voir dans la Figure 9, la méthode utilisée pour identifier les clones contenant les différents plasmides pBBRMCS4-3Flag-RicA\* est semblable à la méthode expliquée dans la Figure 8, sauf que les clones furent mélangés et vérifiés par PCR sur pool et par restriction. Lors de cette étape, l'insertion des allèles 22, 23 et 25 de *ricA* dans le pBBRMCS4-3Flag-GW ne fut pas obtenue.

Ainsi, grâce à l'approche de clonage par Gateway<sup>TM</sup> en trois étapes 24 des 29 allèles de départ furent insérés dans le pBBRMCS4-3Flag-GW. Une fois obtenus, les pools de plasmides pBBRMCS4-3Flag-RicA\* pouvaient être utilisés pour transformer *E. coli* S17 dans le but de permettre la conjugaison avec *B. abortus* 2308.

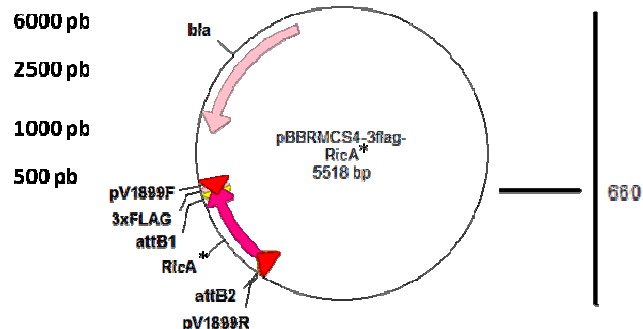
### 3.1.1.2. Obtention des souches de *B. abortus* 2308 et vérification de la stabilité des protéines de fusion 3Flag-RicA

Afin de permettre la conjugaison avec *B. abortus* 2308, l'utilisation d'une souche bactérienne, telle que *E. coli* S17 portant dans son génome les gènes nécessaires à la conjugaison, est requise. Les pools de plasmides pBBRMCS4-3Flag-RicA\* furent donc utilisés pour transformer *E. coli* S17. Suite à cette transformation, les différents clones furent mélangés afin de procéder à la conjugaison avec *B. abortus* 2308, permettant le transfert des

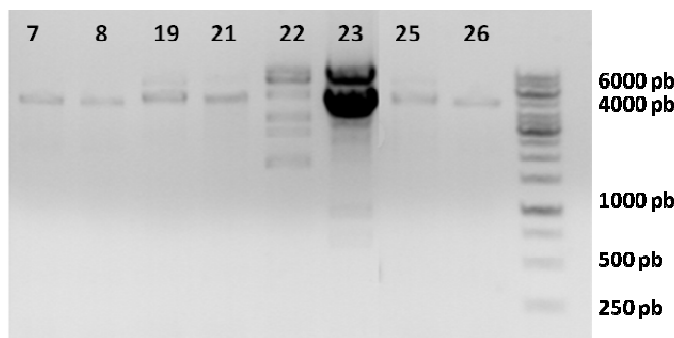
### 1. PCR sur pool



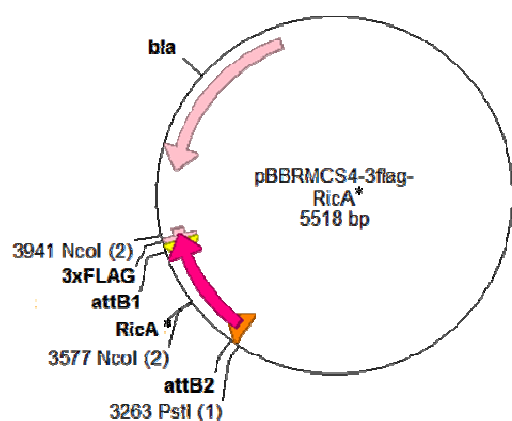
Tailles attendues après PCR:



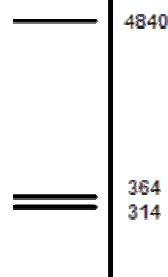
### 2. Restrictions diagnostiques



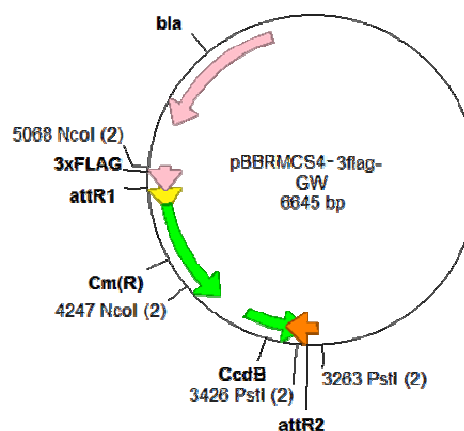
Tailles attendues après restriction:



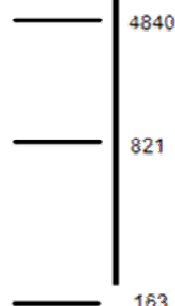
*NcoI + PstI*



Tailles attendues après restriction:



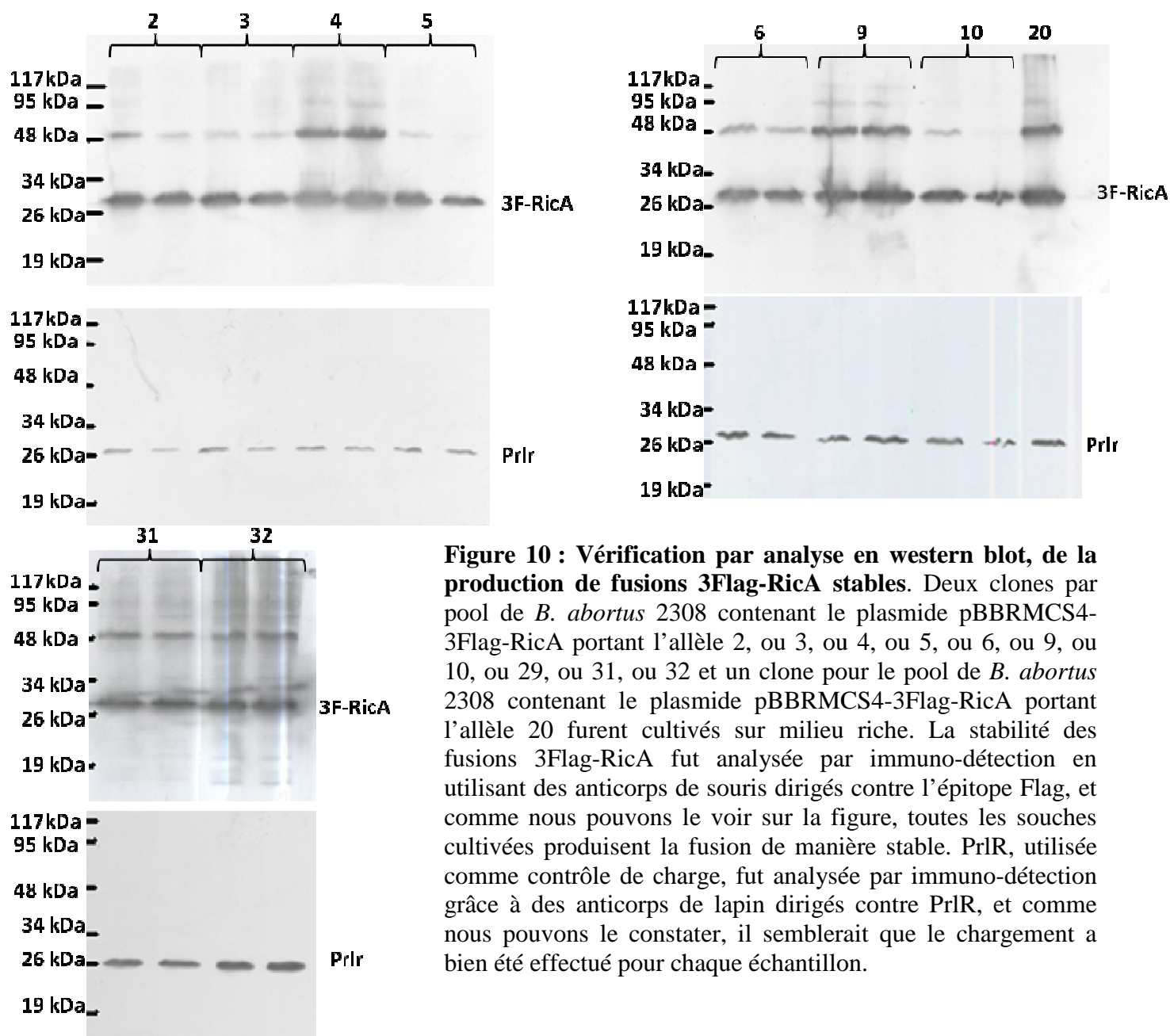
*NcoI + PstI*



**Figure 9 : Vérification de l'insertion de *ricA\** dans le pBBRMCS4-3Flag-GW.** Afin d'obtenir des souches d'*E. coli* portant les pBBRMCS4-3Flag-RicA\* des différents allèles, *E. coli* DH10B fut transformée avec les pBBRMCS4-3Flag-RicA\* résultant de la réaction LR, pour ensuite être sélectionnée sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline. Les clones issus d'une même transformation furent ensuite mélangés et des PCR sur pools furent alors effectuées (dans ce cas-ci, sur 8 pools de *E. coli* contenant le pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant l'allèle 7, ou 8, ou 19, ou 21, ou 23, ou 25, ou 26) afin de permettre la vérification de la présence des plasmides. Le pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant l'allèle 14 fut utilisé comme contrôle positif, et un mix PCR contenant de l'eau à la place des bactéries a été utilisé comme contrôle négatif. Sur la figure, les puits non-annotés ne nous intéressent pas. Nous remarquons néanmoins qu'à l'exception des pools 7 et 8, tous les pools montrent une amplification à la taille attendue, indiquant que la réaction LR ainsi que la transformation de *E. coli* furent, pour la majorité des pools, efficaces. Cependant l'absence d'amplification pour les pools 7 et 8,



peut être expliquée par la faible efficacité de la transformation. Suite à cette vérification par PCR, chaque pool fut vérifié séparément par restriction diagnostique. L'enzyme *NcoI*, coupant dans *ricA\**, dans le pBBRMCS4-3Flag ainsi que dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, et l'enzyme *PstI*, coupant dans le pBBRMCS4-3Flag et dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, furent utilisés pour la restriction diagnostique. Comme nous pouvons le voir sur la figure, les tailles attendues après restriction ne sont pas les mêmes si le pDONR201 porte la cassette Gateway<sup>TM</sup>, ou s'il porte *ricA\**. Grâce à cette différence, nous constatons qu'à l'exception des pools 22 et 23 toutes les souches analysées dans ce cas portaient le pBBRMCS4-3Flag RicA\*.



pBBRMCS4-3Flag-RicA d'*E. coli* S17 vers *B. abortus* 2308. Lors de cette étape de conjugaison, la moitié des souches de *B. abortus* 2308 conjuguées furent contaminées et seuls contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA portant l'allèle 2, ou 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 9, ou 10, ou 20, ou 29, ou 31, ou 32 furent obtenus.

Parmi ces pools de *Brucella* obtenus, à l'exception de celui contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant l'allèle 29, deux clones de chaque pool furent isolés afin de vérifier s'ils produisaient la protéine de fusion 3Flag-RicA\* de manière stable. Dans le but de permettre cette vérification, la production de fusions 3Flag-RicA\* par *B. abortus* 2308 fut analysée par western blot, en utilisant des anticorps de souris dirigés contre l'épitope 3Flag, sur des cultures des différents clones isolés (i.e. 2 clones par pools de *B. abortus* 2308 contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA portant l'allèle 2, ou 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 9, ou 10, ou 31, ou 32 et 1 clone du pool de *B. abortus* 2308 contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA portant l'allèle 20). PrIR, une protéine cytosolique, fut utilisée comme contrôle de charge et analysée par immuno-détection en utilisant des anticorps de lapin dirigés contre PrIR (Figure 10). Comme nous pouvons le voir sur la figure 10, le contrôle de charge, PrIR, indique que chaque échantillon a été chargé en quantité équivalente. De plus, la détection de la fusion 3Flag-RicA\* dans chaque échantillon montre que chaque souche analysée par western blot produit la protéine de fusion 3Flag-RicA\*, et ce de manière stable. Suite à ce test, les résultats révèlent donc une production stable de la fusion pour tous les clones isolés.

Le test de vérification de la production de protéines de fusion 3Flag-RicA\* stables permet donc de montrer que tous les clones de *B. abortus* 2308 isolés produisaient de façon stable la fusion 3Flag-RicA\*. Cette vérification nécessaire est l'étape préliminaire au test de sécrétion *in vitro*. Les souches de *B. abortus* 2308 obtenues peuvent donc être utilisées pour procéder au test de sécrétion *in vitro*.

## 3.2. La levure au service de la caractérisation de RicA

### 3.2.1. Utilisation de l'ALP et de la CPY comme rapporteurs du trafic de la levure

RicA apparaît comme un candidat effecteur pertinent, mais montrer sa sécrétion ne permet pas de conclure que cette protéine possède une activité effectrice sur la cellule hôte. Un moyen de montrer cette activité est d'utiliser la levure afin de mettre en évidence la capacité de la protéine à modifier le trafic vésiculaire intracellulaire de la cellule eucaryote. De manière à pouvoir visualiser cette modification du trafic vésiculaire en levure, l'ALP et la CPY peuvent être utilisés comme protéines rapportrices de l'état du trafic vésiculaire en levure. En effet, comme nous pouvons le voir sur la figure 11C et 11E, si la production du candidat effecteur induit une modulation du trafic vésiculaire, cela pourra être visualisé par analyses en western blot. Lors de ces analyses, la présence des précurseurs de l'ALP et de la CPY témoigne d'un défaut dans le trafic vésiculaire de la levure causé par la présence de la protéine bactérienne.

#### 3.2.1.1. Première étape, obtenir les constructions et les souches

Afin de permettre la mise en place du test, il était nécessaire d'obtenir les souches de levure produisant les protéines bactériennes d'intérêt, à savoir dans un premier temps, LidA.

En effet, LidA fut choisi comme contrôle positif dans notre test, en tant qu'effecteur de *Legionella*. La capacité de LidA à causer un défaut dans le trafic vésiculaire chez la levure a déjà été montrée en utilisant ce test (Heidtman *et al*, 2009). Deux plasmides différents furent utilisés pour produire LidA en levure : le pYESNTA, ainsi que le pYESDEST52 (voir matériel et méthodes pour plus de détails). Le pYESNTA fut choisi car il fut utilisé par Heidtman *et al*, 2009, mais il ne permet néanmoins pas une approche à haut débit aussi facilement que le permettrait le pYESDEST52, qui possède une cassette Gateway<sup>TM</sup>. Le pYESNTA et le pYESDEST52, portant tous deux un promoteur *GALI* inductible au galactose, permettent la mise en place d'un système de régulation modulé par la source de carbone présente dans le milieu (Maya *et al.*, 2008).

Premièrement, le but était de mettre au point le test en levure, pour ensuite pouvoir tester RicA, et par la suite différentes protéines encodées dans l'ORFéome de *B. melitensis* en utilisant le pYESDEST52. L'ORFéome constitue une banque d'ORF de *B. melitensis* insérées sans leur codon stop dans des vecteurs pDONR. Il fallait donc d'une part savoir si le pYESDEST52 pouvait être utilisé dans ce test, et d'autre part si l'insertion dans le pYESDEST52 d'ORF sans codon stop était permise. Pour ce faire, la séquence codante de *lidA* fut insérée dans le pYESDEST52 soit avec un codon stop (LidA-S), soit sans codon stop (LidA-SS). Différents plasmides étaient ainsi à notre disposition, le pYESNTA et le pYESDEST52 vides, servant de contrôles négatifs, et le pYESNTA-LidA, servant de contrôle positif. Nous disposions donc également du pYESDEST52-LidA-S et du pYESDEST52-LidA-SS. Afin de permettre l'expression de ces différentes ORF en levure, la souche de *S. cerevisiae* BY4742 fut transformée par les plasmides obtenus.

### 3.2.1.2. Deuxième étape, mettre au point l'extraction protéique

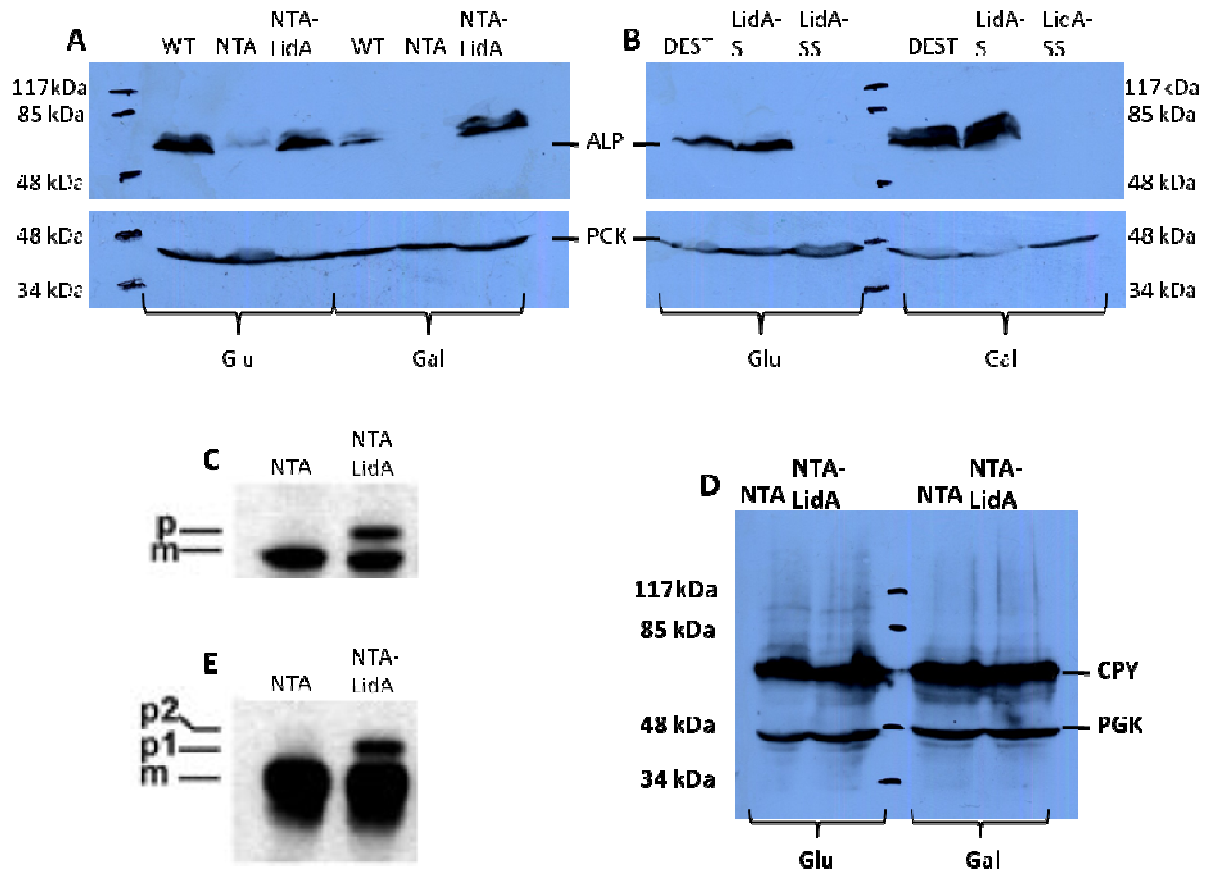
Afin de permettre l'analyse des précurseurs de l'ALP et de la CPY par western blot, il faut tout d'abord extraire les protéines de la levure, après production des protéines bactériennes en levure. Les levures sont donc premièrement cultivées dans un milieu contenant du glucose (Glu), réprimant l'expression de *lidA*. Après croissance, ces cultures sont ensuite diluées et cultivées pendant 5h, soit de nouveau dans du milieu contenant du glucose, soit dans un milieu contenant du galactose (Gal), induisant l'expression de *lidA*. Ces conditions de culture ont été celles adoptées pour tous les tests et permettent ainsi, grâce au milieu Glu, d'avoir un contrôle négatif pour toutes les souches étudiées. Mais également grâce au milieu Gal, de pouvoir étudier l'effet de la production de protéines bactériennes sur le trafic vésiculaire intracellulaire de *S. cerevisiae*. Après 5h de culture, les levures sont lysées dans le but de récupérer des extraits protéiques bruts dans lesquels se trouvent les protéines de la levure. Il existe différents moyens de pratiquer une lyse cellulaire, mais la lyse au NaOH, couramment utilisée au laboratoire fut premièrement utilisée.

Au départ, l'ALP, ayant les modifications post-traductionnelles qui modifient le plus le poids moléculaire, fut choisi comme protéine rapportrice (Figure 11A et 11B). Pour ce test préliminaire les différentes souches de levure obtenues par transformation (i.e. les souches BY4742 portant le pYESNTA, ou le pYESDEST52, ou le pYESNTA-LidA, ou le pYESDEST-LidA-S, ou le pYESDEST-LidA-SS) ainsi que la souche BY4742 non-transformée (nt) furent utilisées. Dans le but d'avoir des contrôles négatifs des plasmides et de la souche de levure, la souche BY4742 nt et les souches BY4742 portant le pYESNTA ou le pYESDEST52 furent utilisées. La souche portant le pYESNTA-LidA, cultivée dans du milieu Gal, représentait le contrôle positif d'altération. Après croissance et extraction protéique, les

précurseurs de l'ALP furent analysés par western blot (Figures 11A et 11B). Les résultats obtenus ne reflétaient pas ceux espérés. En effet, comme nous pouvons le voir dans les figures 11A et 11B, l'accumulation des précurseurs de l'ALP, témoin d'un trafic vésiculaire défectueux chez la levure, est visible chez certains contrôles négatifs (pYESDEST52 Gal, nt Gal, pYESNTA-LidA Glu et nt Glu). De plus, pour certaines souches (pYESNTA Glu et Gal, pYESDEST-LidA-SS Glu et Gal), la bande représentant l'ALP est totalement absente, même si la phosphogycérate kinase (PGK) utilisée comme contrôle de charge indique que l'échantillon a bien été chargé. Ce défaut de trafic en condition de répression peut être lié à des problèmes de transformants. Les plasmides furent donc réutilisés pour transformer *S. cerevisiae* BY4742. Malheureusement, il s'est avéré que le problème d'absence de signal ALP était récurrent, même avec l'utilisation des nouveaux transformants. La CPY fut donc finalement utilisée comme protéine rapportrice.

Dans un premier temps, seul les souches portant le pYESNTA vide et le pYESNTA-LidA furent utilisées. Suite au changement de la protéine rapportrice, maintenant la CPY, l'absence de signal lors de l'immuno-détection ne fut plus un problème. Cependant, comme nous pouvons le voir sur la figure 11D, après culture, aucune des souches ne montre une accumulation des précurseurs de la CPY. Ces résultats, sont en opposition aux résultats obtenus par Heidtman *et al.*, 2009, qui pour des extraits protéiques provenant des mêmes souches de levure, cultivées dans les mêmes conditions, permettaient de montrer que la production de LidA par la souche BY4742 portant le plasmide pYESNTA-LidA, provoquait l'accumulation des précurseurs de la CPY (Figure 11E).

Suite à notre incapacité à montrer une accumulation des précurseurs de la CPY lorsque LidA est produit en levure, et puisque notre approche expérimentale était la même que Heidtman *et al.*, 2009, à l'exception de la méthode de lyse, notre méthode de lyse fut changée. A la place de la lyse au NaOH, la même lyse que Heidtman *et al.*, 2009 fut utilisée, c'est-à-dire une lyse aux billes de verre dans un tampon contenant des antiprotéases. Il était en effet possible, que les antiprotéases, ainsi que l'utilisation du tampon aient un effet important sur la stabilité des extraits analysés. De plus, afin d'écarter le problème d'une éventuelle mauvaise stabilité ou production de LidA, la souche de levure BY4742 fut retransformée par le pYESNTA et le pYESNTA-LidA. Et pour mettre les souches obtenues dans les meilleures conditions possibles, elles ne furent plus mises à 4°C mais constamment gardées à température ambiante après croissance à 30°C. Les transformants obtenus (i.e. les souches BY4742 portant le plasmide pYESNTA vide, ou le pYESNTA-LidA) furent donc cultivés comme dans les tests précédents, et les extraits protéiques furent donc obtenus par lyse aux billes de verre et analysés par western blot en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. Sur la figure 12, nous constatons que la production de LidA sur milieu Gal par la souche de levure BY4742 contenant le plasmide pYESNTA-LidA cause l'accumulation des précurseurs de la CPY, alors que cette accumulation n'est pas visible dans le cas des contrôles négatifs (i.e. la souche BY4742 portant le plasmide pYESNTA vide en condition d'induction en présence de galactose, ainsi que les souches en condition de répression en présence de glucose). Le protocole d'extraction protéique ainsi que la méthode de conservation des souches semblent donc être adapté au test en levure utilisant la CPY, comme témoin d'un défaut du trafic vésiculaire chez la levure.

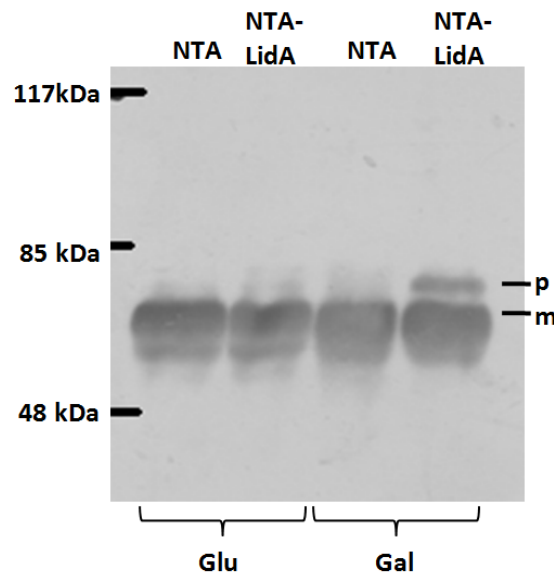


**Figure 11: Utilisation des précurseurs de l'ALP et de la CPY comme témoins du trafic vésiculaire de la levure.** A et B. Les souches BY4742 nt, ou portant le pYESNTA vide (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), ou le pYESDEST52 (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-LidA-SS (LidA-SS), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose en condition de répression (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose en condition d'induction (Gal). Après lyse au NaOH, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les précurseurs de l'ALP furent ensuite analysés par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre l'ALP. La phosphogycérate kinase (PGK) fut utilisée comme contrôle de charge et analysée par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre PGK. Comme nous pouvons le voir sur la figure, certains signaux de l'ALP sont absents (pYESNTA Gal et Glu, pYESDEST52-LidA-SS Glu et Gal) et ce bien que le contrôle de charge indique que tous les échantillons aient été chargés convenablement. De plus, l'accumulation des précurseurs de l'ALP, est visible chez certains contrôles négatifs (pYESDEST52 Gal, nt Gal, pYESNTA-LidA Glu et nt Glu).

C et E. Les souches BY4742 portant le pYESNTA (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), furent cultivées dans du milieu contenant du galactose. Sur la figure, nous pouvons constater que la présence de LidA en levure cause l'accumulation des précurseurs de la CPY (E) et de l'ALP (C). Cette accumulation est représentée par l'apparition d'une bande supplémentaire et qui rapporte un état défectueux du trafic vésiculaire en levure. A l'inverse lorsque LidA n'est pas produite en levure (pYESNTA), la bande supérieure est absente (NTA, E et C) (résultats tirés de Heidtman *et al.*, 2009).

D. Les souches BY4742 portant le pYESNTA (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose (Glu), soit dans un milieu contenant

du galactose (Gal). Après lyse par NaOH, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les précurseurs de la CPY furent ensuite analysés par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. La phosphogycérate kinase (PGK) fut utilisée comme contrôle de charge et analysée par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre PGK. Sur la figure nous remarquons qu'aucune des souches ne montre une accumulation des précurseurs de la CPY. Alors que Heidtman *et al.*, 2009 ont montré que la production de LidA en levure par le pYESNTA en milieu Gal provoquait une accumulation des précurseurs de la CPY (E). p1, p2, p, précurseur ; m, forme mature



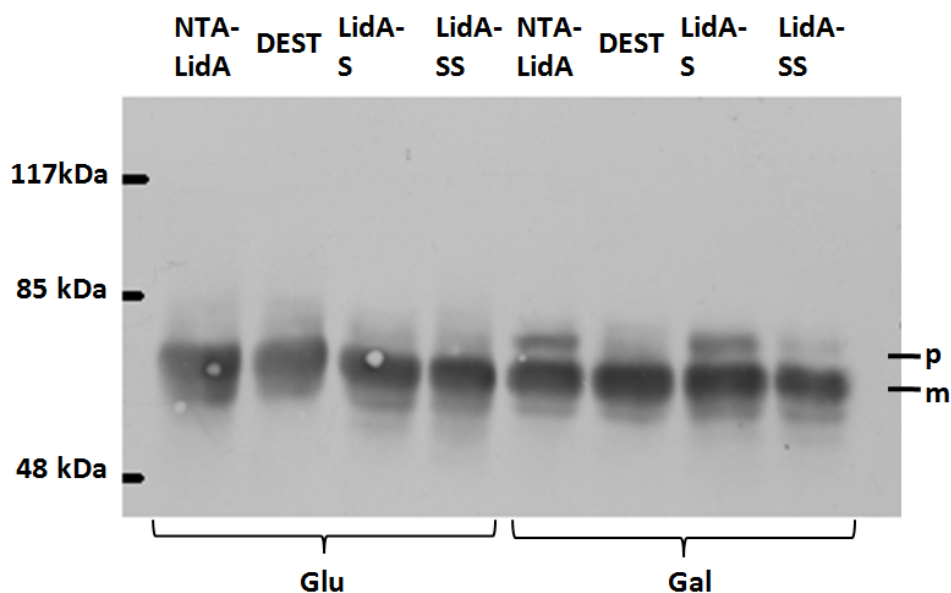
**Figure 12: Analyse par western blot de l'accumulation des précurseurs de la CPY, sur des extraits protéiques obtenus par lyse aux billes de verre.** Les souches BY4742 portant le pYESNTA (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose (Gal). Après lyse aux billes de verre, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les différentes formes de la CPY furent ensuite analysées par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. Sur la figure, nous pouvons constater que NTA-LidA Gal montre l'apparition d'une bande supérieure représentant les précurseurs de la CPY. Alors que toutes les autres conditions représentant les contrôles négatifs ne montrent pas cette accumulation des précurseurs de la CPY. Ainsi, ces résultats montrent que notre test permet de mettre en évidence l'accumulation des précurseurs de la CPY, causée par la production de LidA en levure, rapportant un dérèglement du trafic vésiculaire en levure. p : précurseurs ; m : forme mature.

Les résultats obtenus permirent donc de montrer que le test en levure était mis au point. L'utilisation du pYESDEST52-LidA-S et du pYESDEST52-LidA-SS était donc permise pour d'une part vérifier si le pYESDEST52 pouvait être employé dans ce test, et d'autre part tester si l'insertion dans le pYESDEST52 d'ORF sans codon stop permettait tout de même de voir un effet de la protéine d'intérêt.

Ainsi dans le test, les souches utilisées furent cultivées dans les mêmes conditions que le test précédent. Afin de permettre un contrôle négatif du plasmide, la souche portant pYESDEST52 vide fut utilisée. Et la souche portant le pYESNTA-LidA cultivée en présence

de galactose fut utilisée comme contrôle positif. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 13, les résultats obtenus mettent en évidence qu'en conditions d'induction le contrôle positif pYESNTA-LidA ainsi que le pYESDEST52-LidA-S montrent une accumulation des précurseurs de la CPY, alors que les contrôles négatifs ne montrent pas cette accumulation. Nous pouvons également remarquer l'apparition d'une légère bande à la taille des précurseurs de la CPY pour LidA-SS sur la Figure 13. Alors que les contrôles négatifs ne présentent pas cette accumulation, mais un signal semblant être aspécifique. La souche BY4742 portant le pYESDEST52-LidA-SS montre donc également une accumulation des précurseurs de la CPY, mais de façon nettement moins prononcée que La souche BY4742 portant le pYESDEST52-LidA-S. Ceci indique donc que l'utilisation d'ORF sans codon stop insérée dans le pYESDEST52 ne semble pas être adaptée au test.

Néanmoins ce test permit de montrer que, dans nos conditions d'expérimentations, le pYESDEST52 pouvait être utilisé pour exprimer des ORF bactériennes possédant un codon stop, afin de permettre une analyse en western blot des précurseurs de la CPY, reflétant l'état du trafic vésiculaire intracellulaire de la levure.



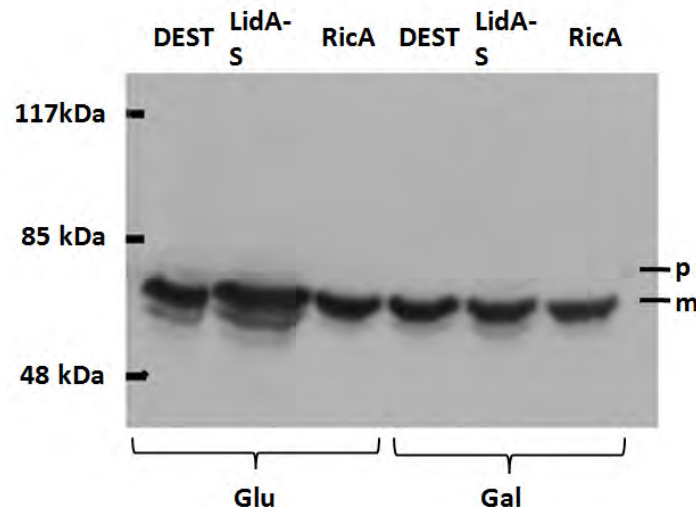
**Figure 13: Analyse par western blot de la CPY afin de tester l'utilisation du pYESDEST52 pour produire LidA en levure.** Les souches BY4742 portant le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), ou le pYESDEST52 (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-LidA-SS (LidA-SS), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose (Gal). Après lyse aux billes de verre, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les différentes formes de la CPY furent ensuite analysées par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. Sur la figure nous pouvons remarquer une accumulation des précurseurs de la CPY dans le cas de NTA-LidA Gal (contrôle positif), ainsi que pour LidA-S Gal. A l'inverse, les souches cultivées dans un milieu contenant du glucose, et le DEST Gal (contrôles négatifs), ne montrent pas cette accumulation. Par ailleurs, nous pouvons observer sur la figure que l'accumulation des précurseurs de la CPY n'est pas très nette dans le cas de LidA-SS Gal. Il semblerait donc que l'utilisation du pYESDEST52, afin de produire des protéines bactériennes en levure, est permise dans notre approche expérimentale. Cependant,



la séquence codante insérée dans le pYESDEST52 semble devoir posséder son codon stop, afin de permettre un effet de la protéine d'intérêt suffisant à la visualisation de l'accumulation des précurseurs de la CPY. p : précurseurs ; m : forme mature.

### 3.2.1.3. Troisième étape, utiliser le test mis au point pour caractériser RicA

Dans le but de tester si RicA pouvait, tout comme LidA, causer un défaut dans le trafic vésiculaire en levure visible par analyse western blot des précurseurs de la CPY, la séquence codante de *ricA* fut insérée avec son codon stop, par réaction LR, dans le pYESDEST52. Le plasmide ainsi obtenu fut utilisé pour transformer *S. cerevisiae*. Dans ce test, le contrôle négatif fut la souche BY4742 portant le plasmide pYESDEST52 vide. Le plasmide pYESDEST52-LidA-S fut utilisé comme contrôle positif. Les souches contrôles ainsi que la souche de levure BY4742 portant le plasmide pYESDEST52-RicA furent utilisés pour tester l'effet de RicA sur le trafic vésiculaire de la levure, dans les mêmes conditions de culture et de lyse que le test précédent. Néanmoins les résultats obtenus ne reflètent pas ceux espérés, en effet, la production de RicA ne semble pas perturber le trafic de la levure de façon visible par l'analyse western blot des précurseurs de la CPY. Cependant, comme nous pouvons le constater sur la Figure 14, l'accumulation des précurseurs de la CPY pour LidA-S (le contrôle positif) n'est pas aussi importante que dans la figure 13. Pour cette raison, et afin de s'assurer que RicA n'ait pas d'effet sur le trafic visible par l'analyse des formes de la CPY, le test devra être répété.



**Figure 14: Caractérisation de l'effet RicA sur le trafic vésiculaire de la levure par analyse western blot de la CPY** Les souches BY4742 portant le pYESDEST52 (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-RicA, furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose en condition de répression (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose en conditions d'induction (Gal). Après lyse aux billes de verre, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les formes de la CPY furent ensuite analysées par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. Sur la figure, nous pouvons voir qu'aucune souche ne montre une accumulation des précurseurs de la CPY, à l'exception de LidA-S Gal (contrôle positif). Néanmoins, en ce qui concerne LidA-S Gal, l'accumulation des précurseurs de la CPY est représentée par une bande très faiblement visible. p : précurseurs ; m : forme mature.

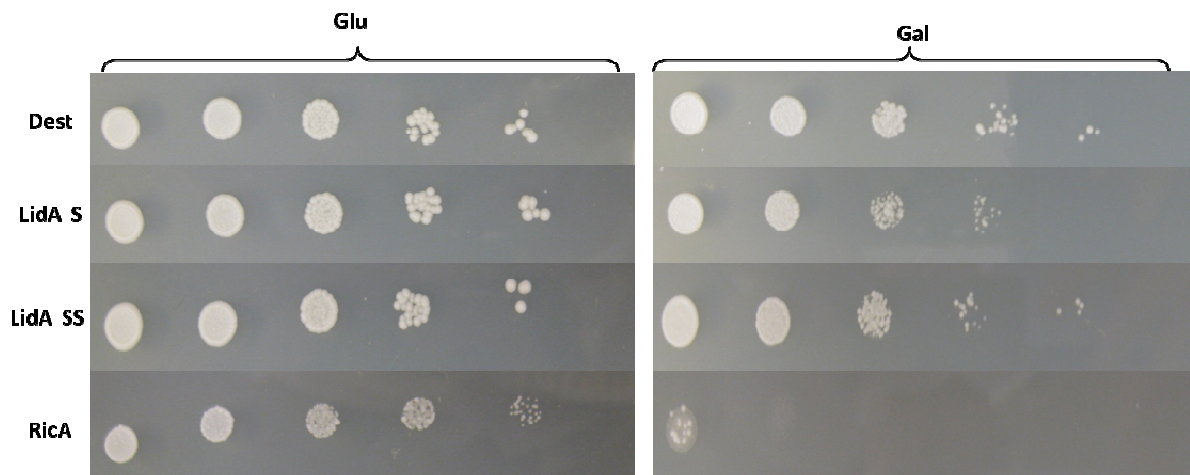


### 3.2.2. Le test de croissance, un outil sensible pour détecter la présence d'effecteurs

Il semblerait donc que RicA ne perturbe pas le trafic vésiculaire de façon visible par une analyse par western blot de l'accumulation des formes de la CPY. Cependant, il est évident que cela ne veut pas dire que RicA n'a pas d'effet sur le trafic vésiculaire, ou encore sur un autre mécanisme moléculaire intracellulaire. Un autre moyen de montrer un effet de RicA sur la cellule eucaryote est le test de cytotoxicité. De plus, les plasmides utilisés pour le test d'analyse du trafic vésiculaire en levure, possèdent un promoteur *GALI* inductible au galactose adapté à la mise en place du test de croissance.

Pour le test de toxicité, les mêmes souches de levures que celles utilisées pour le test d'analyse du trafic vésiculaire (i.e. la souche BY4742 portant le plasmide pYESDEST52 vide, ou le pYESDEST52-LidA-S, ou le pYESDEST52-LidA-SS, ou le pYESDEST52-RicA) furent mises en culture dans un milieu contenant du glucose. Après croissance des levures, les cultures furent lavées avec de l'eau stérile afin d'enlever le glucose. Des séries de dilutions, de 10 en 10, furent réalisées et déposées soit sur boîte contenant du glucose, soit sur boîte contenant du galactose (Figure 15). Ces dilutions permettent d'évaluer la toxicité de la production de la protéine bactérienne, si la protéine est fortement toxique l'inhibition de croissance se fera même pour les faibles dilutions, et inversement. Dans ce test, les souches ayant poussé sur milieu contenant du glucose représentent les contrôles négatifs et permettent d'évaluer la capacité des levures à pousser lorsqu'il n'y a pas d'induction par présence de galactose. Par contre, sur le milieu contenant du galactose, seule la souche portant le pYESDEST52 vide représente le contrôle négatif. Sur la figure 15, nous pouvons remarquer que les levures ayant été cultivées sur milieu glucose, poussent à toutes les dilutions. Cependant, nous pouvons également voir que, bien que la souche portant le pYESDEST52-RicA pousse aux mêmes dilutions que les autres souches, la taille des colonies semble plus faible que les autres souches. En ce qui concerne les souches ayant poussé sur milieu contenant du galactose, nous pouvons constater, que la production de RicA est fortement toxique pour la levure. En effet lorsque RicA est produit en levure, sa toxicité est trop forte pour permettre la croissance de colonies de levure après dilution 10x de la culture, alors que les souches de levure qui n'expriment pas de protéines bactériennes (DEST Gal, contrôles négatifs), croissent de façon comparable aux souches sur milieu contenant du glucose. L'effet fortement toxique de RicA visualisé sur milieu contenant du galactose est à mettre en relation avec le phénotype des petites colonies observées sur milieu contenant du glucose. En effet, l'observation de petites colonies suite à la croissance de la souche de levure BY4742 contenant le plasmide pYESDEST52-RicA sur milieu contenant du glucose montre que RicA pourrait avoir un effet toxique sur la levure, même s'il n'est que très faiblement produit en conditions de répression du promoteur *GALI* par le glucose. Sur la figure 15, nous pouvons également voir que LidA, rapporté dans la littérature comme ayant un effet toxique en levure (Heidtman *et al.*, 2009), ne montre pas une cytotoxicité aussi importante que RicA. En effet, nous pouvons constater que LidA-S semble être légèrement toxique pour la levure, cependant cet effet cytotoxique ne semble pas être détectable dans le cas de LidA-SS.

Le test de croissance a ainsi permis de prendre du recul face à l'action de RicA, et de montrer un effet RicA sur la levure. Ce test, désigné comme un outil sensible et spécifique indiquant un caractère effecteur d'une protéine bactérienne (Siggers and Lesser, 2008), permet de renforcer la pertinence de RicA en tant que candidat effecteur de *B. abortus*. Grâce à cet effet cytotoxique de RicA en levure, un outil facile est disponible et permet la mise en place de beaucoup de perspectives qui sont discutées dans le point suivant.



**Figure 15: Caractérisation de la cytotoxicité de LidA et de RicA en levure.** Les souches de levure BY4742 portant le plasmide pYESDEST52 vide (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-LidA-SS (LidA-SS), ou le pYESDEST52-RicA (RicA) furent cultivées overnight dans un milieu de répression contenant du glucose. Les cultures furent ensuite ajustées à  $DO_{600}=1$ . Ensuite après lavages, des séries de dilution 10x furent déposées soit sur milieu contenant du glucose (Glu, contrôles négatifs), ou sur milieu contenant du galactose (Gal). Les différentes photos furent prises 2 jours après croissance à 30°C. Alors que les souches LidA-S et LidA-SS, montre une croissance comparable aux contrôles négatifs (DEST sur galactose, et les souches ayant été cultivées sur glucose), RicA montrent très clairement une forte cytotoxicité. Cette toxicité est d'ailleurs légèrement visible sur milieu contenant du glucose par la visualisation de plus petites colonies par rapport au contrôle négatif.

# Conclusions et perspectives

## 4. Conclusions et perspectives

Au cours de l'évolution, les bactéries pathogènes, telles que *Brucella spp.*, ont acquis les mécanismes moléculaires nécessaires à leur prolifération dans leur cellule hôte, tels qu'une capacité à moduler le trafic vésiculaire intracellulaire de la cellule hôte (Brumell and Scidmore, 2007). Dans le cas de *Brucella spp.*, des protéines connues sous le nom de protéines effectrices vont lui permettre, entre autres, de dévier le trafic intracellulaire normal de la cellule hôte afin d'établir, dans une organelle dérivée du RE, sa niche de prolifération (Starr *et al.*, 2008). Néanmoins, et bien que le trafic de *Brucella spp.* ait déjà été fortement étudié, aucune protéine de *Brucella spp.* avec une fonction effectrice n'est connue à l'heure actuelle. Dans le but de trouver ces protéines effectrices, un crible double-hybride a été effectué au laboratoire, utilisant toutes les protéines prédites de *B. melitensis*, et dirigé contre les protéines phagosomales humaines, ce qui permit d'identifier l'interaction entre RicA et Rab2. Par la suite différentes recherches ont permis de caractériser RicA, et ont notamment montré sa sécrétion en condition de culture en milieu défini. De plus, la caractérisation d'un mutant de délétion pour *ricA* permet de montrer que RicA aurait un rôle à jouer dans la cinétique du trafic intracellulaire de *B. abortus* (non-publié).

La sécrétion de RicA semblerait être indépendante du T4SS. Les signaux portés par RicA et qui pourraient être impliqués dans la sélection de RicA par un système de sécrétion, sont encore, inconnus. D'autre part, l'impact sur la cellule eucaryote, de la capacité de RicA à interagir avec Rab2, n'est pas encore caractérisé.

### 4.1. Caractérisation de la sécrétion de RicA

Le test de sécrétion *in vitro* a été proposé comme approche expérimentale, dans le but de trouver les acides aminés de RicA impliqués dans les mécanismes moléculaires de sa sécrétion. En l'appliquant à 29 formes mutées de RicA, qui gardent néanmoins leur capacité d'interaction avec Rab2, du moins dans le noyau de la levure. Ces données suggèrent que leur repliement est, au moins en ce qui concerne les régions impliquées dans l'interaction, relativement stable (Nkengfac, non-publié).

Grâce à la méthode de clonage Gateway<sup>TM</sup> 24 des 29 allèles de *ricA\** furent insérée dans le pBBRMCS4-3F-GW et les plasmides ainsi obtenus furent utilisés pour transformer *E. coli* S17 pour permettre la conjugaison avec *B. abortus* 2308. Les plasmides pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant ces cinq allèles non-insérés (i.e. les allèles 16, 22, 23, 25 et 28), devront être obtenus, dans le but de permettre la transformation de souches S17. Lors de la conjugaison 11 pools de *B. abortus* 2308 sur les 24 ont été obtenus (i.e. les pools de *B. abortus* 2308 contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant l'allèle 2, ou 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 9, ou 10, ou 20, ou 29, ou 31, ou 32). Des analyses en western blot utilisant des anticorps de souris dirigés contre l'épitope Flag permirent de sélectionner au moins un clone par pools de *Brucella* produisant des protéines de fusion 3Flag-RicA\* de façon stable (Figure 10), à l'exception du pool de *B. abortus* 2308 contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant l'allèle 29 pour lequel aucun clone isolé n'a pu être testé.

Ainsi grâce à cette vérification, dix souches de *B. abortus* 2308 produisant dix formes mutées différentes de la fusion 3Flag-RicA\*, sont disponibles pour procéder au test de sécrétion *in vitro*. Cependant, l'obtention des dernières souches de *B. abortus* 2308 est évidemment nécessaire afin d'augmenter le nombre d'allèles de *ricA\** représentés dans le test

de sécrétion *in vitro* et donc la probabilité de trouver une forme mutée non-sécrétée. Il faudra donc refaire la conjugaison, en incluant les souches de S17 encore à obtenir. L'isolement de clones produisant la fusion de manière stable, devra être effectué afin de pouvoir procéder au test de sécrétion *in vitro*, avec ces mêmes clones.

### 4.1.1. Test de sécrétion *in vitro*

Afin d'être sécrétées, les protéines se doivent de porter une séquence signal qui leur permettra d'être reconnues par le système de sécrétion. Dans le cas du T4SS, par exemple, une séquence signal C-terminale semble être nécessaire à la sécrétion des protéines (de Jong *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2005; Vergunst *et al.*, 2000). Néanmoins, malgré une minutieuse analyse de séquence, aucune séquence signal n'a pu être mise en évidence chez RicA. De ce fait, l'utilisation des formes mutées de RicA dans le test de sécrétion *in vitro*, pourrait apporter des informations précieuses, dans la recherche des acides aminés impliqués dans la sécrétion de RicA.

En effet, si lors du test de sécrétion *in vitro* des formes mutées de RicA ne parvenaient pas à être sécrétées, cette incapacité de RicA à être sécrété pourrait être expliquée par implication des acides aminés mutés dans la reconnaissance de RicA par un système de sécrétion. De plus, la capacité d'interaction avec Rab2 des formes de RicA\* utilisées, montrent que leur repliement est relativement stable du moins dans le noyau de levure, et donc une structure 3D qui serait relativement proche de celle de RicA sauvage. Ceci appuierait l'hypothèse que les acides aminés mutés n'empêcheraient pas un repliement correct de la protéine qui serait nécessaire à sa sécrétion.

Dès lors la question qui s'imposerait serait de savoir quelle serait l'implication de ces acides aminés dans la sécrétion de RicA. Notre approche pourrait alors être complétée par la création de mutants par mutagenèse dirigée. Cette mutagenèse peut se faire de différentes façons. Il est par exemple possible de procéder à l'examen d'un modèle 3D de RicA, pour définir les résidus qui devraient être mutés. Une autre approche consisterait à remplacer par PCR une partie de la séquence de *ricA\**, dans laquelle se trouve la mutation d'intérêt, par des codons de séquence aléatoire. Les mutants ainsi obtenus pourraient alors être utilisés dans le test de sécrétion *in vitro* afin de savoir si l'acide aminé, potentiellement impliqué dans la sécrétion de RicA, est dans un signal de sécrétion. Néanmoins, la stabilité des protéines devra être vérifiée afin d'écarter la possibilité que l'absence de sécrétion soit due à un problème de repliement de la protéine. Partant du principe qu'un repliement stable est nécessaire à l'interaction entre Rab2 et RicA, la stabilité de la forme mutée pourrait être vérifiée par test double-hybride, pouvant montrer que la forme mutée a toujours la capacité d'interagir avec Rab2. Un autre moyen de caractériser la stabilité de protéine, est d'exposer les protéines sauvages et mutées à des concentrations croissantes d'agent dénaturant, et d'évaluer le dépliement en mesurant la fluorescence des résidus Trp (Mann *et al.*, 1993). La concentration dénaturante, nécessaire au dépliement complet de la protéine, donne une idée de sa stabilité. Si la protéine n'est pas stable la concentration en agent dénaturant nécessaire à sa dénaturation sera faible, et inversement.

Outre les questions liées aux implications directes ou indirectes des acides aminés mutés, une des limitations les plus importantes du test est d'être effectué en condition *in vitro*. En effet, les conditions dans lesquelles le test de sécrétion est effectué ne reflètent pas les conditions auxquelles les bactéries *B. abortus* sont confrontées lors de leur processus

d'invasion. De ce fait, il serait intéressant de tester la sécrétion de RicA dans un test de sécrétion en contexte d'infection.

#### 4.1.2. Test de sécrétion en contexte d'infection

Dans le cadre de la caractérisation de la sécrétion de RicA, nous avons également participé à l'utilisation de la  $\beta$ -lactamase dans un test de sécrétion en contexte d'infection. Approche pour laquelle les données ne sont pas reprises dans ce mémoire. Néanmoins, l'utilisation de ce test pourrait être intéressante afin de montrer que les résultats, qui pourraient être obtenus suite à la construction de mutants par mutagenèse dirigée, en conditions *in vitro*, sont en accord avec un test en condition d'infection cellulaire.

### 4.2. Caractérisation de l'action de RicA sur la cellule eucaryote

La sécrétion de RicA fut montrée en condition *in vitro* et doit encore être démontrée en conditions d'infection. Cependant, montrer que des protéines sont sécrétées par *B. abortus*, ne signifie pas que ces protéines ont automatiquement une action effectrice sur la cellule hôte. Néanmoins dans le cas de RicA, sa capacité d'interaction avec Rab2 (Nkengfac, non-publié), et le phénotype du mutant de délétion pour *ricA* en condition d'infection (Jamet *et al.*, non-publié), suggèrent fortement le caractère effecteur de RicA. L'approche que nous avons proposé, afin de pouvoir caractériser l'action de RicA sur la cellule eucaryote, est d'utiliser la levure comme modèle eucaryote. La levure fut d'une part utilisée dans le but de caractériser l'effet de RicA perturbe le trafic vésiculaire intracellulaire de la levure, par analyse de protéines rapportrices telles que l'ALP et la CPY. D'autre part la levure permet, grâce au test de croissance, de vérifier si la production de RicA en levure à un effet toxique, qui apparaît comme un moyen sensible d'indiquer une activité effectrice (Siggers and Lesser, 2008).

#### 4.2.1. Utilisation de l'ALP et de la CPY comme témoin de l'état du trafic vésiculaire intracellulaire de la levure

Grâce aux modifications post-traductionnelles que subissent l'ALP et la CPY lors de leur trafic vésiculaire, il est possible de montrer une perturbation du trafic vésiculaire intracellulaire de la levure par analyse western blot de ces deux protéines. Dans le cadre de la recherche d'effecteurs, l'ALP et la CPY peuvent donc être utilisées comme protéines rapportrices de l'état du trafic vésiculaire en levure, résultant de la production de protéines bactériennes (Heidtman *et al.*, 2009). Pour cette raison, ce test fut choisi afin de tester RicA dans un premier temps, mais également différentes protéines de *Brucella spp.*.

Afin de pouvoir mettre en place une approche à grande échelle, le pYESDEST52, permettant l'utilisation de la méthode Gateway<sup>TM</sup>, ainsi qu'un système de régulation grâce à son promoteur *GAL1*, fut choisi pour ce test. Dans le but de vérifier que l'utilisation du pYESDEST52 était permise dans notre approche expérimentale, LidA fut donc utilisée comme contrôle positif. LidA fut donc produite en levure à partir du même plasmide que Heidtman *et al.*, 2009, le pYESNTA-LidA, dans le but de mettre au point les différentes étapes du test. Suite à ces mises au point, le test étant concluant (Figure 12), et l'utilisation du pYESDEST52 pouvait être testée. L'utilisation dans le test des souches BY4742 portant le plasmide pYESDEST52 vide, ou le pYESDEST52 portant la séquence codante de *lidA* avec

ou sans son codon stop (Figure 13) montrera que le pYESDEST52 pouvait être employé dans notre approche expérimentale. Néanmoins, il semblerait également que l'action de LidA soit fortement réduite, lorsque celle-ci était produite sans son codon stop, à partir du pYESDEST52. En effet, sur la figure 13, nous pouvons remarquer que l'expression du pYESDEST52-LidA-SS en condition d'induction provoque bien une accumulation des précurseurs de la CPY, mais celle-ci est nettement moins marquée que pour LidA-S, rendant l'interprétation de cette légère bande subjective. Ces résultats suggèrent donc, que l'utilisation du pYESDEST52 dans une approche à haut débit, permettant de produire les protéines encodées dans l'ORFéome de *B. melitensis* dans un crible utilisant la CPY comme protéine rapportrice de l'état du trafic vésiculaire de la levure pourrait être difficile.

Cependant, il semble tout de même que la production de LidA-SS ait un effet perturbateur, bien qu'il serait plus léger. Cette diminution peut être due à l'ajout des épitopes V5 et 6xHis provoqué par l'absence du codon stop. Il serait néanmoins intéressant de refaire le test avec les mêmes échantillons mais en augmentant la quantité de protéines chargées sur le gel SDS-PAGE. En effet, la quantité de protéines ayant été normalisée par quantification Bradford avant dépôt sur gel, l'augmentation de la quantité de protéines pourrait déterminer la quantité de protéines minimum à déposer sur gel afin de pouvoir voir l'effet LidA-SS sur le trafic vésiculaire en levure. Un autre moyen serait d'insérer un codon stop après le site *attB2* du pYESDEST52, permettant ainsi l'utilisation des séquences de l'ORFéome tout en limitant la longueur de la queue d'acides aminés ajoutée à la protéine d'intérêt, et qui peut perturber son activité. Cette construction, si elle rend l'action de LidA détectable, pourrait permettre de tester toutes les ORF de l'ORFéome de *B. melitensis*, non seulement dans le test utilisant la CPY comme protéine rapportrice de l'état du trafic vésiculaire de la levure, mais également dans le test de croissance (voir point 5.2.2.1).

Les résultats ayant permis de montrer que, dans nos conditions d'expérimentation, le pYESDEST52 pouvait être utilisé afin d'exprimer *lidA* en levure dans le but de montrer un effet de la production de LidA sur le trafic vésiculaire de *S. cerevisiae*, *ricA* fut alors inséré dans le pYESDEST52, afin de tester l'effet de la production de RicA en levure sur le trafic vésiculaire de *S. cerevisiae* (Figure 14). Suite au test, et bien que le contrôle positif (LidA-S Gal) soit très faible, il semblerait que RicA n'ait pas d'effet sur le trafic de la levure tel que visualisé par l'accumulation des précurseurs de la CPY. Néanmoins, comme l'accumulation des précurseurs de la CPY fut faiblement marquée pour le contrôle positif (LidA-S Gal) il faudra refaire le test, afin de confirmer les résultats obtenus.

L'absence de l'accumulation des précurseurs de la CPY en présence de RicA ne signifie pas que RicA n'ait pas d'effet sur le trafic. Différentes hypothèses permettent d'expliquer cela. Il est par exemple possible que RicA agisse sur la cinétique du trafic de la levure en l'accéléralant ou en le ralentissant, le mouvement vésiculaire n'est donc pas bloqué et l'accumulation des précurseurs de la CPY n'est pas visible. D'un autre côté, il se peut que la toxicité de RicA en levure, qui sera discuté dans le point 5.2.2, ne permette pas la croissance des clones portant le pYESDEST52-RicA, et dans lesquels l'action de RicA est permise. De ce fait, le test ne reflèterait pas l'effet de RicA sur le trafic vésiculaire de la levure, mais plutôt le trafic vésiculaire des clones adaptés et pour lesquels RicA n'aurait pas d'effet. Ainsi, le test ne serait pas représentatif de l'action de RicA. Un moyen de remédier à cela est d'utiliser un autre système d'induction, permettant une croissance dans un premier temps des levures et ensuite une induction de la production de la protéine d'intérêt à un moment précis.

Il serait intéressant de tester la localisation de RicA en levure. Pour ce faire la production de fusion RicA-GFP (sous le contrôle d'un promoteur régulier), pourrait être choisie comme approche expérimentale. En effet, l'utilisation de protéines de fusion entre GFP et des effecteurs bactériens a déjà permis de montrer la localisation de ces effecteurs en levure dans des études comparables (Lesser and Miller, 2001).

### 4.2.2. La croissance de la levure, reflet de son état cellulaire

Bien que l'utilisation de RicA en levure n'ait pas donné de résultat concluant, afin de mettre cela à profit le pYESDEST52-RicA l'utilisation de la souche portant pYESDEST52-RicA dans un test de croissance a été proposée. De plus LidA, reportée dans la littérature comme ayant un effet cytotoxique sur la levure (Heidtman *et al.*, 2009), a également été ajoutée au test.

Les résultats obtenus (Figure 15), montrent que la production de RicA en levure provoque un effet fortement toxique. Ainsi, RicA perturberait des mécanismes moléculaires clés de la levure, résultant en une perte importante de croissance. La diminution de la capacité de croissance, due à la production de protéines bactériennes en levure, est décrite dans la littérature comme un outil sensible dans la recherche d'effecteurs bactériens (Siggers and Lesser, 2008). Il est cependant bien qu'il soit possible que l'effet de RicA soit accentué par une surproduction imposée par le promoteur *GALI*. En ce qui concerne LidA, comme décrit dans la littérature il apparaît que LidA ait un effet toxique en levure (Figure 15). Néanmoins, cet effet n'est pas visible dans le cas de LidA-S, montrant l'importance du codon stop dans la séquence codante de la protéine d'intérêt. Il se peut cependant que l'effet de RicA en levure soit souche-dépendant. Pour vérifier cela, il est possible de simplement transformer une autre souche de levure avec le pYESDEST52-RicA, afin de faire le test de croissance.

L'effet cytotoxique de RicA, nous apporte un outil, et peut être utilisé pour nous permettre de mieux étudier l'action de RicA sur la cellule eucaryote. Ce sont ces différentes utilisations possibles qui sont discutées dans le point suivant.

#### 4.2.2.1. Utilisation de la perte de croissance due à la présence de RicA

Dans le but de caractériser l'effet de RicA sur la croissance de la levure, il est possible de mettre à profit sa capacité d'interaction avec Rab2. Nous pourrions par exemple, surproduire Rab2 en utilisant un plasmide permettant une surexpression de *rab2*. Si cette sur-expression diminue la toxicité de RicA en levure, ceci montrerait que la surproduction de RicA limiterait le nombre de protéines RicA interagissant avec les protéines de la levure. Cette expérience permettrait de suggérer que la région d'interaction avec RicA serait la même pour Rab2 que pour les protéines de levure, et que la perte de croissance est bien dépendant de RicA. Cette approche serait facile à mettre en place et ne demanderait que la co-transformation de *S. cerevisiae* avec le pYESDEST52-RicA, et un plasmide sur-exprimant *rab2*, afin de procéder au test de croissance. Il faudra cependant, vérifier que la surproduction de Rab2 seul ne soit pas toxique pour la levure, un contrôle devra donc être fait, consistant à transformer *S. cerevisiae* seulement avec le plasmide de sur-expression de *rab2*. Il est également possible que l'interaction entre RicA et Rab2 ne soit pas assez forte pour sauver la croissance de la levure. Néanmoins le but n'est pas de montrer que la levure co-transformée par le pYESDEST52-RicA et le plasmide sur-exprimant *rab2* ait la même capacité de



croissance que la souche sauvage, mais bien de montrer que la production de Rab2 augmente la capacité à croître de la levure même si la souche co-transformée n'atteint pas le niveau de croissance de la souche non-transformée.

Un autre moyen de mettre à profit cette toxicité, est de tenter de rechercher des levures résistantes à cette toxicité. Pour ce faire, il est possible d'utiliser une banque de mutants de délétion en levure, dans le but de savoir quel mutant serait capable de pousser normalement malgré la production de RicA. Cette observation permettrait de relier l'action de RicA à une protéine de la levure et ainsi comprendre sur quel mécanisme moléculaire RicA agit afin de permettre un tel dérèglement de l'état normal de la levure. Une telle approche permet déjà de montrer que IpgB2, un effecteur de *Shigella flexneri* toxique pour la levure, interagissait avec la voie des MAP-kinase (Alto *et al.*, 2006).

Dans le but de pouvoir mettre en place un crible à l'échelle de l'ORFéome, il pourrait être intéressant de voir si l'insertion de *ricA* sans son codon stop dans le pYESDEST52 pourrait également avoir un effet cytotoxique. Si l'effet toxique est visible malgré l'absence de codon stop, les ORF de l'ORFéome de *B. melitensis* pourraient être insérées dans le pYESDEST52, afin d'effectuer un crible se basant sur la perte de capacité de croissance de la levure, due à la présence de protéines de *B. melitensis*. Cependant, l'absence du codon stop, pourrait parfois fortement diminuer l'action de la protéine bactérienne sur la levure, étant donné l'ajout des épitopes V5 et 6xHis. Plusieurs résultats du crible pourraient donc être des faux négatifs et donc passer inaperçu. La construction du plasmide pYESDEST52 avec un codon stop après son site *attB2*, pourrait limiter ce problème. Cependant, il faudra tout de même rester prudent face aux résultats du test, car il apparaît que la production de certaines protéines non-sécrétées peuvent également affecter la croissance de la levure (Campodonico *et al.*, 2005). Le crible devrait donc être complété par d'autres approches. D'une part, les candidats pourraient être analysés avec le test évaluant l'état du trafic vésiculaire en levure en utilisant la CPY comme protéine rapportrice. De plus, il serait également intéressant, de tester les candidats issus du crible pour leur capacité à être sécrétés par *Brucella spp.* en contexte d'infection. Des mutants de délétions de ces ORF pourraient également être construits, afin d'en caractériser la capacité infectieuse.

### 4.3. Conclusion générale

L'utilisation de nos différentes approches expérimentales, nous a permis de mieux caractériser RicA, en montrant que la production de RicA en levure provoquait une forte cytotoxicité, permettant d'augmenter la pertinence de cette protéine en tant que candidat effecteur de *Brucella spp.*. Cet effet cytotoxique de RicA nous apporte également un outil permettant la mise en place d'un crible dans le but de rechercher des protéines effectrices de *Brucella spp.*. Mise à part les résultats obtenus grâce aux tests en levure, des souches de *B. abortus* 2308 contenant des allèles mutés de *ricA*, fusionnés à un épitope 3Flag, sont disponibles et peuvent être utilisées dans un test de sécrétion *in vitro*. Et bien que d'autres souches devront encore être testées, ce test de sécrétion *in vitro* pourra nous apporter des informations précieuses dans la recherche des acides aminés impliqués dans les mécanismes moléculaires utilisés pour la sécrétion de RicA.

Je n'ai pas échoué. J'ai simplement trouvé 10.000 solutions qui ne fonctionnent pas.  
[Thomas Edison]

# Matériel et méthodes

## 5. Matériel et méthodes

### 5.1. Souches et plasmides

#### 5.1.1. Bactéries

Souches	Génotypes	Explications complémentaires
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX</i> 74 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara139</i> ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> - <i>rpsL</i> (StrR) <i>nupG</i>	Souche utilisée pour l'amplification plasmidique. GibcoBRL (Invitrogen).
<i>E. coli</i> DB3.1	F- <i>gyrA</i> 462 <i>endA1</i> ( <i>sr1-recA</i> ) <i>mcrB</i> <i>mrr hsdS</i> 20(rB-, mB-) <i>supE</i> 44 <i>ara</i> -14 <i>galK</i> 2 <i>lacY</i> 1 <i>proA</i> 2 <i>rpsL</i> 20(SmR) <i>xyl</i> -5 - <i>leu mtl</i> 1	Souche résistante à la toxine <i>ccdB</i> grâce à un allèle <i>gyrA</i> 462. Elle est utilisée pour l'amplification de vecteurs Gateway™ (Invitrogen).
<i>E. coli</i> S17	<i>recA</i> <i>thi</i> <i>pro</i> <i>hsdR</i> - <i>M</i> + <i>RP4</i> ::2- <i>Tc</i> :: <i>Mu</i> :: <i>Km</i> <i>Tn</i> 7	Cette souche possède le plasmide RP4 intégré dans son génome, lui permettant de transférer par conjugaison un plasmide pourvu d'une origine de transfert (Invitrogen)
<i>B.</i> <i>abortus</i> 2308		La souche de <i>B. abortus</i> utilisée pour ce travail, résistante à l'acide nalidixique (NalR)

#### 5.1.2. Levures

Souche	Génotype	Explications complémentaires
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ1</i> <i>lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Souche de <i>S. cerevisiae</i> utilisée dans nos différents tests en levure. Cette souche fut également utilisée par Heidtman <i>et al.</i> , 2009.

#### 5.1.3. Plasmides

Plasmides	Commentaires
pDONR201	Il s'agit d'un vecteur donneur utilisé pour le clonage par le système Gateway™ de fragments d'ADN d'intérêt (Invitrogen). Il possède les sites de recombinaison <i>attP1</i> et <i>attP2</i> flanquant la cassette Gateway™. Cette cassette contient, notamment, le gène codant la toxine <i>ccdB</i> ainsi que le gène de résistance au chloramphénicol <i>cat</i> . Ce plasmide porte également le gène de résistance à la kanamycine <i>kanR</i> et une origine de réplication chez <i>E. coli</i> , pUC ori. L'ORFéome de <i>Brucella</i> est entièrement cloné dans ce vecteur. La réaction LR entre les pDONR-ORFs et un vecteur de destination pourvu de site <i>attR</i> , permettra l'échange de l'ORF et de la cassette Gateway™ située dans le vecteur de destination.

<b>pYESDEST52</b>	Il s'agit d'un vecteur de destination pour le clonage Gateway™. Ce vecteur possède les sites de recombinaison <i>attR1</i> et <i>attR2</i> . Le pYES-DEST52 est un plasmide épisomique (multicopies, origine de répllication 2μ), permettant l'expression chez la levure <i>S. cerevisiae</i> ainsi que l'expression chez <i>E.coli</i> grâce à l'origine de répllication pUC ori. Le vecteur pYES-DEST52 porte également le promoteur <i>GAL1</i> permettant une expression régulée en levure des ORFs clonées, le marqueur de sélection <i>URA3</i> et le gène de résistance à l'ampicilline <i>bla</i> .
<b>pYESNTA</b>	Il s'agit du plasmide utilisé par Heidtman et al, 2009 afin de permettre la production de protéines bactériennes en levure, permettant donc l'expression chez la levure <i>S. cerevisiae</i> grâce à son origine de répllication 2μ. Ce plasmide permet aussi l'expression chez <i>E.coli</i> grâce à l'origine de répllication pUC ori. Le vecteur pYESNTA porte également le promoteur <i>GAL1</i> permettant une expression régulée en levure des ORFs clonées, le marqueur de sélection <i>URA3</i> et le gène de résistance à l'ampicilline <i>bla</i> .
<b>pYESNTA-LidA</b>	pYESNTA dans lequel la séquence codante de lidA à été insérée. Reçu de Heidtman <i>et al.</i> , 2009.
<b>pBBRMCS4-3Flag-GW</b>	Il s'agit d'un vecteur de destination pour le clonage Gateway™. Ce vecteur possède les sites de recombinaison <i>attR1</i> et <i>attR2</i> . Le plasmide possède également un épitope 3Flag et un gène de résistance à l'ampicilline <i>bla</i> .

## 5.2. Milieux, tampons et solutions

### 5.2.1. Milieux bactéries

#### 5.2.1.1. Préparation des stocks d'antibiotiques (concentrés 1000X)

	<b>Cc finale</b>	<b>Cc stock</b>	<b>solution</b>
<b>Kan</b>	50 μg/mL	50 mg/mL	dH <sub>2</sub> O
<b>Nal</b>	25 μg/ml	25 mg/ml	NaOH 0,2N
<b>Amp</b>	100 μg/mL	100 mg/mL	dH <sub>2</sub> O
<b>Carb</b>	50μg/mL	50mg/mL	dH <sub>2</sub> O

Préparer 5 ml de solution stock de chaque antibiotique dans un berlin. Aliquoter dans des eppendorfs en filtrant au travers d'un filtre de 0,22 μm (Millipore).

#### 5.2.1.2. Milieu LB (Luria Bertani)

Pour un litre d'eau désionisée :

<b>Hydrolysate de caséine (peptone)</b>	10 g
<b>NaCl</b>	5 g
<b>Yeast extract</b>	5 g
<b>Agar si requis</b>	15 g

Autoclaver le milieu et ajouter le ou les antibiotiques si nécessaire.

#### 5.2.1.3. Milieux riches pour *Brucella abortus* : milieu 2YT

Pour un litre d'eau désionisée :

	Forme liquide	Forme solide
<b>Mix pour LB liquide</b>	20 g	35 g
<b>Hydrolysate de caséine (peptone)</b>	6 g	6 g
<b>Yeast extract</b>	5 g	5 g
<b>Agar si requis</b>	-	1 g

Le milieu 2YT + sucrose 5% (5 gr de saccharose pour 100 ml de milieu) est utilisé pour sélectionner la désintégration du plasmide pJQ200-uc1 du génome de *Brucella abortus*.

### 5.2.2. Milieux pour levures

#### 5.2.2.1. Milieu minimum

	1L	400mL
<b>Sucre 2%</b>	20 g	8 g
<b>Sucre 1% si requis</b>	10 g	4 g
<b>Yeast Nitrogen Base (YNB) sans acides aminés</b>	6,75 g	2,7 g
<b>Agar si requis</b>	20 g	8 g

#### 5.2.2.2. Milieu Sc (Synthétique complet)

- ❖ Préparer et autoclaver : milieu minimum + 1,3 g/L de mix poudrés d'acides aminés (aa) (0,52 g/400 mL). Peser d'abord le YNB sans aa et le mix d'aa, porter à 80% du volume final avec de l'eau désionisée et mettre à pH 5,6. Ensuite ajouter le(s) sucre(s) et l'agar avant de compléter au volume final avec de l'eau désionisée et d'autoclaver. Considérer dans le volume final l'ajout des aa (His, Leu, Trp, Ura) après autoclave.
- ❖ Ajouter après autoclave et en fonction de la sélection voulue : 8 mL/L des stocks d'aa suivants : Leu (100 mM), His (100 mM), Trp (40 mM, filtré et conservé à 4°C et à l'abri de la lumière), Ura (20 mM).

Nous avons travaillé avec deux types de milieu Sc : du Sc glucose 2% et du Sc galactose 2% raffinose 1%. Le Sc glucose 2% (Glu), représente le milieu réprimant l'expression chez la levure par le pYESDEST52 et le pYESNTA. A l'inverse, le Sc galactose 2% raffinose 1% (Gal) représente le milieu induisant l'expression chez la levure par le pYESDEST52 et le pYESNTA. Dans ces deux milieux l'a.a. Ura ne fut pas rajouté afin de permettre une pression de sélection

#### 5.2.2.3. Milieu YEPD (Yeast Extract bacto-Peptide D-glucose)

	1L	400mL
<b>D-glucose 2%</b>	20 g	8 g
<b>Yeast extract</b>	10 g	4 g
<b>Bacto-peptone</b>	20 g	8 g
<b>Agar si requis</b>	20 g	8 g

Compléter au volume final avec de l'eau désionisée ; autoclaver ensuite.

### 5.2.3. Préparation de tampons et solutions

Tampons/solutions	composants	quantité	commentaire
Tampon PBS 20X	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KCl NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22,98 g/L 4 g/L 160 g/L 4 g/L	
Tampon TE 10X	Tris HCl pH 8 EDTA	100 mM 10 mM	Porter au volume souhaité avec de l'eau désionisée puis autoclaver
Tampn TAE 50X	Tris HCl pH 8 EDTA Acide acétique glacial	40 mM 50 mM 57,1 mL	Porter à un volume de 1L avec de l'eau désionisée
Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10X	LiAc	10,2 g	Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau désionisée et autoclaver
Polyéthylèneglycol (PEG) 50%	PEG 4000	50 g	Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau désionisée, puis stériliser au moyen d'un filtre de 0,45 µm (Millipore)
LiAc/TE 1X	LiAc 10X TE 10X H <sub>2</sub> O	1/10 <sup>ème</sup> de volume 1/10 <sup>ème</sup> de volume 8/10 <sup>ème</sup> de volume	
LiAc/TE/PEG	LiAc 10X TE 10X PEG 50%	1/10 <sup>ème</sup> de volume 1/10 <sup>ème</sup> de volume 8/10 <sup>ème</sup> de volume	
CaCl <sub>2</sub> 60mM	CaCl <sub>2</sub> (147,02 g/mol)	8,82 g	Peser 8,82 g de CaCl <sub>2</sub> et porter à un volume de 1L
SDS-sample buffer	Tris-HCl pH 6,8 β-mercaptoéthanol SDS Bleu de bromophénol Glycérol	60 mM 4% 4% 0,01% 5%	
Laemmli Buffer 2X	SDS glycérol β-mercaptoethanol bleu de bromophénol Tris HCl	4% 20% 10% 0,004% 0,125 M	

Hepes buffer	Hepes NaCl EDTA Antiprotéase complete de Roche	20 mM 150 mM 2 mM 1 tablette pour 50 mL	Une fois les antiprotéases ajoutés, garder sur glace.
SDS-sample buffer	Tris-HCl, pH 6.8; β-mercaptoethanol; SDS; Bromophenol blue; glycerol	60 mM 4% 4% 0.01% 5%	

#### ❖ Poudre d'acides aminés

Mélanger 6 g de chacun de ces acides aminés: alanine, arginine, acide asparatique, asparagine, cystéine, acide glutamique, glutamine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine. Ajouter 6 g d'adénine sulfate. Quatre acides aminés ne sont pas présents dans cette poudre mais seront ajoutés au milieu en fonction de la sélection souhaitée. Il s'agit du tryptophane, de l'histidine, de l'uracile et de la leucine.

#### ❖ Solutions concentrées d'acides aminés

Histidine-HCl 100 mM, autoclaver.

Uracile 20 mM, autoclaver.

Tryptophane 40 mM, filtrer (filtre 1,22 µm Millipore) et conserver à 4°C et à l'abri de la lumière.

Leucine 100 mM, autoclaver.

### 5.3. Techniques relatives à l'ADN

#### 5.3.1. Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN d'intérêt, grâce à des amorces ou primers (tableau ci-dessous) qui s'hybrideront sur celui-ci, à une polymérase thermorésistante (*Taq* polymérase de Promega ou *Phusion* polymérase) et à la présence de dNTPs.

Amorce	Séquence d'ADN 5'→3'	Utilisation
<b>LidA-F</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTCGatggcaaaagataacaaatcac	Ajout de site <i>attB1</i> lors de l'amplification de <i>lidA</i>
<b>LidA-R (stop)</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTAttatgatgtcttgaatggagat	Ajout de site <i>attB2</i> lors de l'amplification de <i>lidA</i>
<b>LidA-R (sans stop)</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGtatgatgtcttgaatggagata	Ajout de site <i>attB2</i> lors de l'amplification de <i>lidA</i> sans son codon stop
<b>AD</b>	CGCGTTTGGAATCACTACAGGG	Amplification des allèles de <i>ricA*</i> avec les sites <i>attB</i> au départ de miniprep de levure
<b>TERM</b>	GGAGACTTGACCAAACCTCTGGCG	Amplification des allèles de <i>ricA*</i> avec les sites <i>attB</i> au départ de miniprep de levure

<b>Amorce forward</b>	atatgccgatctatgcatataacgg	Vérification de l'insertion de <i>ricA*</i> dans le pDONR201
<b>Amorce reverse</b>	ggatcctgaggcaggctccat	Vérification de l'insertion de <i>ricA*</i> dans le pDONR201
<b>pV1899R</b>	atcaccctctagatcacaccac	Vérification de l'insertion de <i>ricA*</i> dans le pBBRMCS4-3Flag-GW
<b>pV1899F</b>	ggggtaccatggactacaaaga	Vérification de l'insertion de <i>ricA*</i> dans le pBBRMCS4-3Flag-GW

Dans nos approches expérimentales, la PCR fut non seulement utilisée dans l'obtention des différentes constructions, mais également dans la vérification de l'insertion de séquence codante dans un plasmide donné. La méthode utilisant la polymérase *Taq* fut choisie pour les différentes étapes de l'obtention des pBBRMCS4-3Flag-RicA\*. La méthode utilisant la polymérase *Phusion* fut choisie dans la construction du pYESDEST52-LidA-S et du pYESDEST52-LidA-SS, en raison de son activité proofreading.

#### Méthode avec la polymérase *Taq*

Mix PCR	Programme
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 µL de tampon 5X correspondant à l'enzyme</li> <li>- 4 µL de mix de dNTPs (5 mM chaque)</li> <li>- 0,5 µL de primer forward (20 µM)</li> <li>- 0,5 µL de primer reverse (20 µM)</li> <li>- 0,35 µL de polymérase (<i>Taq</i>)</li> <li>- Matrice (1-10ng)</li> <li>- Porter à 50 µL avec de l'eau désionisée</li> </ul>	Dénaturation → 4' à 94°C Amplification 25-30 cycles de 3 étapes : <ul style="list-style-type: none"> <li>- dénaturation → 45 sec à 94°C</li> <li>- hybridation → 1 min à <math>T_m - 2</math> à 5°C</li> <li>- élongation → 1 min/kb à 72°C</li> </ul> Elongation finale → 10 min à 72°C

Pour les PCR sur colonies le même mix sera réalisé en remplaçant la matrice par de l'eau désionisée. A ce mix, sera ajouté l'équivalent d'une colonie de levure, le programme PCR est le même que ci-dessus. En ce qui concerne les PCR sur pool, 1µL du pool dilué 10x est utilisé comme matrice.

#### Méthode avec la polymérase *Phusion*

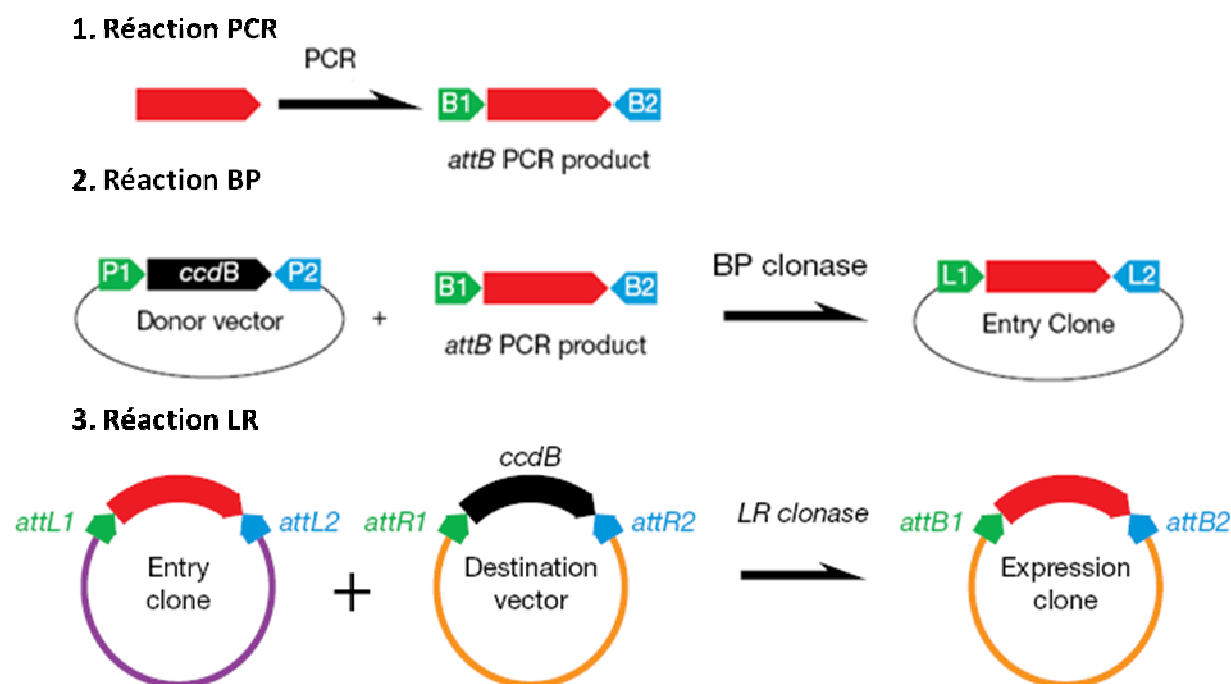
Mix PCR	Programme
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 µL de tampon 5X correspondant à l'enzyme</li> <li>- 4µL de mix de dNTPs (10 mM chaque)</li> <li>- 0,5 µL de primer forward (20 µM)</li> <li>- 0,5 µL de primer reverse (20 µM)</li> <li>- 0,35µL de polymérase (<i>Phusion</i>)</li> <li>- Matrice (1-10ng)</li> <li>- Porter à 50µL avec de l'eau désionisée</li> </ul>	Dénaturation → 30'' à 98°C Amplification 25-30 cycles de 3 étapes : <ul style="list-style-type: none"> <li>- dénaturation → 10 sec à 98°C</li> <li>- hybridation → 10-30 sec à <math>T_m - 2</math> à 5°C</li> <li>- élongation → 30 sec/kb à 72°C</li> </ul> Elongation finale → 10 min à 72°C



Les produits PCR obtenus furent séquencés, afin d'éviter d'éventuelles mutations.

### 5.3.2. Clonage Gateway<sup>TM</sup>

La méthode de clonage par Gateway<sup>TM</sup> (voir ci-dessous) permet la mise en place facile d'une approche à haut débit. Dans nos approches expérimentales, *ricA\** fut inséré dans le vecteur de destination pBBRMCS4-3Flag-GW et *lidA* avec ou sans codon stop ainsi que *ricA* furent insérés dans le pYESDEST52. Pour chaque construction, le pDONR201 fut choisi comme vecteur donneur.



**Représentation schématique de l'approche de clonage par Gateway<sup>TM</sup> (Invitrogen life technologies).** Cette approche se divise en 3 étapes. La première étape consiste à amplifier la séquence d'intérêt par PCR en y ajoutant des sites *attB1* et *attB2* aux extrémités 5'. L'ajout de ces sites *attB* va permettre une recombinaison avec les sites *attP* avec le vecteur donneur, cette réaction, appelée « réaction BP » est permise grâce à l'activité de la BP clonase. La troisième étape consiste en une deuxième réaction de recombinaison, celle-ci est appelée « réaction LR » et est médiée par la LR clonase. Cette réaction recombine les sites *attL1* et *attL2* du vecteur d'entrée, avec les sites *attR1* et *attR2* du vecteur de destination respectivement. Ceci permettra l'obtention du vecteur d'expression portant la séquence d'intérêt. La sélection des clones d'entrée et des clones d'expression est permise grâce à l'insertion de la séquence d'intérêt dans le vecteur donneur et dans le vecteur de destination. Cette insertion va en fait provoquer la perte de la cassette Gateway<sup>TM</sup> qui porte un gène *ccdB* permettant une contre-sélection. En effet, CcdB va interagir avec l'ADN gyrase de souches *E. coli* « *ccdB* sensibles », ce qui va conduire à une inhibition de leur croissance. La cassette est également composée d'un marqueur de résistance au chloramphénicol, permettant une sélection des clones non-recombinant. Grâce à cette cassette Gateway<sup>TM</sup> et aux marqueurs de résistance des vecteurs donneurs et des vecteurs de destination, les bactéries sensibles

transformées ne survivent que si elles incorporent un plasmide pour lequel la réaction de recombinaison a convenablement eu lieu.

### Méthode

Réaction BP artificielle	Réaction LR artificielle
1 µl (150 ng) de pDONR201	3 µl de vecteur d'entrée
3 µl de réaction PCR du gène d'intérêt	3 µl de vecteur de destination
2 µl de tampon de dilution BP	2 µl de tampon de dilution LR
2 µl d'enzyme clonase BP	0,8 µl d'enzyme clonase LR
2 µl d'H <sub>2</sub> O distillée	1,2 µl d'H <sub>2</sub> O distillée
Incubation à 25°C de 2 à 24h	Incubation à 25°C de 2 à 24h

### 5.3.3. Restriction enzymatique

La restriction enzymatique présente deux objectifs principaux : le premier est la restriction diagnostique, le second est la restriction dans la cadre du clonage. Dans notre cas elle fut utilisée à des fins diagnostiques.

### Méthode

Mix pour un volume final 10µL	Protocole
<ul style="list-style-type: none"> <li>- maximum 5 µL de minipréparation</li> <li>- 1 µL de tampon 10X (en fonction des enzymes)</li> <li>- quantité d'enzyme à calculer en fonction de la formule suivante :  <math display="block">Q \text{ (unités)} = (48,5/tp) \cdot qp \cdot (np/n\lambda)</math> <p>tp = taille plasmide en kb  qp = quantité plasmide à restreindre (µg)  np = nombre de sites de restriction dans le plasmide  nλ = nombre de sites dans le génome du phage lambda</p> </li> <li>- ajuster le volume avec de l'eau désionisée</li> </ul>	<p>Faire des mastermix contenant tout sauf le plasmide à restreindre. Ajouter le mastermix au plasmide. Ensuite mettre 30 min à 2h à 37°C. Une fois la restriction réalisée, déposer et faire migrer dans un gel d'agarose (bromure d'éthidium) si nécessaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 µL de la restriction + 1 µL de tampon de chargement</li> <li>- contrôle non restreint avec le même volume de plasmide que ce qui a été introduit dans la restriction + 1 µL de tampon de chargement + eau désionisée pour obtenir un volume final de 10 µL</li> </ul>

### 5.3.4. Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue, permettant de vérifier la taille des produits de PCR ou de restriction. Comme marqueur de taille, nous utilisons l'HyperLadder de Bioline. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEth), composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre ses bases.

### Méthode

- Dissoudre par chauffage Y g d'agarose dans Z mL de tampon TAE 1X, où Y/Z représente le pourcentage en agarose (en général 1%, 2% lors de la détection de la fragmentation d'ADN). Un pourcentage en agarose plus élevé en agarose améliore la résolution des bandes de plus petites tailles.
- Ajouter 5 µL de bromure d'éthidium.

- Une fois que la température du flacon atteint  $\sim 60^{\circ}\text{C}$ , couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits.
- Charger les échantillons auxquels a été ajouté au moins un dixième de solution d'alourdisseur et charger le marqueur de poids moléculaire en parallèle (5  $\mu\text{L}$ )

## 5.4. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

### 5.4.1. Préparation de cellules chémo-compétentes (DH10B)

Pour transformer des bactéries, il est nécessaire de les rendre compétentes afin de faciliter l'entrée de l'ADN. Pour la transformation bactérienne par choc thermique, la paroi et la membrane bactérienne sont rendues perméables à l'ADN grâce à des passages dans une solution hypotonique de chlorure de calcium.

#### Méthode

- La veille placer la solution de  $\text{CaCl}_2$  au frigo, les biberons et les tubes falcons au congélateur ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) (et éventuellement les pipettes). Placer le LB liquide à  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Le jour J, inoculer 24 mL de préculture de DH10B dans 2,4 L de LB liquide. Laisser pousser à  $37^{\circ}\text{C}$ , jusqu'à obtention d'une  $\text{DO}_{590\text{ nm}}$  de 0,375.
- Répartir la culture dans 6 biberons de 200 mL et garder le reste sur glace. Laisser 10' sur glace.
- Centrifuger les 6 premiers biberons 7 min à 3000 rpm et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Vider le surnageant et transvaser le reste de la culture sur les culots des 6 biberons.
- Centrifuger de nouveau 7 min à 3000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Vider le surnageant et resuspendre délicatement dans 200 mL de  $\text{CaCl}_2$  60 mM par biberon.
- Centrifuger 5 min à 2500 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Vider le surnageant et resuspendre dans 50 mL  $\text{CaCl}_2$  60 mM par biberon. Ensuite transvaser pour avoir 2 biberons de 150 mL.
- Laisser 30 min sur la glace.
- Centrifuger 5 min à 2500 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Vider le surnageant et resuspendre dans 25 mL  $\text{CaCl}_2$  glycerol 15% par biberon. Répartir en 2 tubes falcons de 50 mL.
- Centrifuger une dernière fois 10 min à 2500 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Vider les surnageants et resuspendre les 2 culots dans un volume final de 8 mL, en un seul falcon.
- De la solution finale, aliquoter selon la convenance, puis congeler au  $-80^{\circ}$  jusqu'à utilisation.

### 5.4.2. Transformation bactérienne : choc thermique

- Dégeler les cellules (DH10B  $\text{CaCl}_2$  compétentes) sur glace. Ajouter 1  $\mu\text{L}$  de plasmide ou 5  $\mu\text{L}$  de produit LR aux 50  $\mu\text{L}$  de cellules et resuspendre. Veiller à ne pas dépasser  $1/10^{\text{ème}}$  du volume de cellules, pour la quantité de plasmide. Laisser 30 min sur glace.
- Procéder au choc thermique, en mettant les cellules dans le bain à  $42^{\circ}\text{C}$  45 sec puis sur glace pendant 2 min. Ajouter 950  $\mu\text{L}$  du milieu LB et placer les cellules à  $37^{\circ}\text{C}$  durant 30 min à 1h avec agitation.
- Centrifuger 10 min à 2000 rpm. Reprendre 900  $\mu\text{L}$  du surnageant. Resuspendre dans les 100  $\mu\text{L}$  restant et étaler sur milieu LB avec l'antibiotique de sélection.

### 5.4.3. Conjugaison

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse amène, via un pili sexuel, un plasmide conjugatif contenant

une origine de transfert vers une bactérie receveuse. La souche donneuse (dans notre cas S17) possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

### **Méthode**

- Lancer en culture, la veille, les souches de *Brucella abortus* (2YT) et d'*Escherichia coli* S17 (LB). Incuber à 37°C.
- Mettre 1 ml de phase stationnaire de bactéries à transformer (ici *Brucella abortus*) dans un tube eppendorf.
- A ce tube eppendorf, ajouter 50 µl de cellules *Escherichia coli* S17 contenant le plasmide d'intérêt.
- Centrifuger les tubes eppendorf pendant 1 min à 7000 rpm.
- Enlever le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de milieu 2YT.
- Centrifuger pendant 1 min à 7000 rpm.
- Enlever le surnageant en y laissant une petite quantité de liquide sur le culot (environ 50 µl).
- Resuspendre le culot avec le liquide restant et spoter la préparation sur des petites boîtes de milieu 2YT.
- Incuber pendant 4 h à 37°C (plasmides réplicatifs) ou à température ambiante toute la nuit (plasmides intégratifs).
- Après incubation, étaler les cellules sur milieu sélectif 2YT avec l'antibiotique approprié et de l'acide nalidixique. Pour un plasmide réplicatif, strier sur les boîtes. Pour un plasmide intégratif, resuspendre les bactéries dans 300 µl de 2YT et étaler sur 3 boîtes avec l'antibiotique approprié et de l'acide nalidixique.
- Incuber pendant 3 à 4 jours à 37°C.

#### **5.4.4. Analyse de la production de 3Flag-RicA\***

Afin de permettre la vérification de la production de fusion 3Flag-RicA\* de manière stable, des analyses par western blot ont été effectuées sur des cultures de *B. abortus* 2308

### **Méthode**

- La veille, lancer 5mL culture 2YT de *B. abortus* 2308. Incuber à 37°C.
- Prendre DO<sub>600nm</sub> et concentrer à une DO<sub>600nm</sub> de 10 (dans de l'eau désionisée stérile)
- Mélanger 10 µl de cette solution à 10 µl de Laemmli Buffer 2X
- Faire bouillir 5-10', pour lyser *B. abortus*.
- Les échantillons obtenus sont ensuite analysés en gel SDS-PAGE.

#### **5.4.4.1. Analyses en western blot**

Les analyses en western blot sont décrites dans le point 5.1. Dans le cadre de la vérification de la production de fusion 3Flag-RicA\* stables, ce sont des anticorps de souris dirigés contre l'épitope 3Flag ainsi que des anticorps de lapin dirigés contre PrIR qui furent utilisés.

## 5.5. Techniques relatives à l'utilisation de levures

### 5.5.1. Transformation levure

Il s'agit de faire entrer un plasmide dans des cellules de levures rendues auparavant compétentes grâce à l'acétate de lithium et au polyéthylèneglycol.

#### Méthode

- La veille, lancer la levure BY4742 en culture dans 5mL dans YPD. Incuber à 30°C.
- Inoculer 50mL de YPD avec ~2mL de la culture pour avoir une  $D_{600nm}$  ~0,4. Incuber à 30 °c jusqu'à obtention d'une  $DO_{600nm}$  ~ 0,7- 0,8
- Centrifuger à 4000rpm pendant 5 à 10 min
- Vider le surnageant et resuspendre dans 25mL d'eau dionisée stérile
- Centrifuger à 4000rpm pendant 10 min
- Vider le surnageant et resuspendre dans 1mL d'eau de LiAc 100mM
- Transvaser dans un eppendorf et centrifuger 1 min à 13000rpm
- Vider le surnageant et resuspendre dans 400µL LiAc 100mM.
- Aliquoter par 50µL (en fonction du nombre de transformation à effectué)
- Dénaturer l'ADN de sperme de Saumon (10mg/mL) 5 min à 100°C et puis mettre sur glace.
- Centrifuger les aliquots 1 min à 14000rpm et enlever le surnageant à la pipette
- Ajouter dans l'ordre sur le culot de cellules :
  - o 240µL de PEG 50%
  - o 36µL de LiAc 1M
  - o 10µL de ssDNA 10mg/mL
  - o X mL de plasmide (~4µg)
  - o Ajuster à 360 µL avec de l'eau désionisée stérile
- Vortexer vigoureusement et incuber 30 min à 30°C
- Réaliser un choc thermique dans un bain à 42°C pendant 30 min
- Centrifuger 1 min à 14000 rpm et enlever le surnageant
- Resuspendre chaque culot dans 200µL d'eau désionisée stérile
- Etaler 50 à 150µL sur boîte contenant un milieu sélectif et incuber 3 jours à 30°C

### 5.5.2. Analyse de l'ALP et de la CPY

#### 5.5.2.1. Lyse au NaOH

L'extraction protéique consiste à lyser les levures afin d'en extraire les protéines et de préparer les échantillons pour le western blot.

#### Méthode

- La veille, lancer 5mL de préculture (Sc-Ura ou YPD, en conditions de répression Glu) des souches de levure à lyser. Incuber à 30°C.
- Le jour de l'extraction protéique, diluer les cultures obtenues à  $DO_{600nm} = 1,5$  dans du milieu Glu ou dans du milieu d'induction Gal.
- Après 5h à 30°C sous agitation, mesurer la  $DO_{600nm}$  et prélever dans deux eppendorfs par culture (pour réaliser des extraits totaux et non-totaux) le volume nécessaire pour avoir 1,5 unité de  $DO_{600nm}$  où une unité de  $DO_{600nm}$  correspond à l'équivalent d'1 mL de culture à  $DO_{600nm}$  de 6.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 7 min.
- Laver avec 1 mL d'eau désionisée.

- Centrifuger à 8000 rpm pendant 7 min.
- Enlever le surnageant et resuspendre dans 100µL d'eau désionisée puis ajouter 100 µL de NaOH 0,2M.
- Laisser 5 min à température ambiante.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 7 min.
- Ajouter 50µL de SDS-sample buffer
- Faire bouillir 3 min.

Les échantillons ainsi obtenus peuvent être utilisés en gel SDS-PAGE

#### 5.5.2.2. Lyse aux billes de verre

- La veille, lancer 2x 10mL de préculture (Sc-Ura en conditions de répression Glu) des souches de levure à lyser. Incuber à 30°C.
- Le jour de l'extraction protéique, mesurer la  $DO_{600nm}$  et diluer les cultures obtenues à  $DO_{600nm} = 1,5$  dans 25mL de milieu Glu ou de milieu d'induction Gal.
- Après 5h à 30°C sous agitation, laver les cellules avec de l'Hepes buffer, à partir de ce moment rester sur glace (4°C)
- Centrifuger 5 min à 4000rpm, resuspendre dans 1mL de l'Hepes buffer et transférer dans un eppendorf de 1,5mL. Culoter et retirer le surnageant.
- Ajouter 200µL d'Hepes buffer au culot de cellules, resuspendre,
- Ajouter l'équivalent de 1,5mL de billes de verre à l'ensemble culot+tampon dans un eppendorf à capuchon vissé,
- FastPrep vitesse 6 pendant 20 sec (2x)
- A l'aide d'une aiguille, trouser l'eppendorf à capuchon vissé et le placer sur un nouvel eppendorf puis centrifuger 1 à 2 sec à 4000rpm et récupérer la partie liquide de l'Eppendorf du dessous,
- Ajouter 800µL d'Hepes buffer, et centrifuger 10 min à 14000 rpm et à 4°C,
- Récupérer le surnageant contenant les protéines solubles.

Afin de déterminer l'efficacité de l'extraction, un dosage par test de Bradford est ensuite effectué.

#### 5.5.2.3. Analyses en western blot

Les analyses en western blot sont décrites dans le point 5.1. Dans le cadre de l'analyse des différentes formes de l'ALP et de CPY après lyse par NaOH, ce sont des anticorps de souris dirigés contre l'ALP ainsi que des anticorps de souris dirigés contre la PGK qui furent utilisés. Alors que dans le cadre de l'analyse des différentes formes de la CPY après lyse aux billes de verre, seuls des anticorps de souris dirigés contre CPY furent utilisés. Car le dosage par test de Bradford a permis de normaliser la quantité de protéines déposée sur gel à 0,07mg.

#### 5.5.3. Test de croissance

Afin de comparer la capacité de croissance de différentes souches de levures, les souches d'intérêts sont cultivées overnight dans un milieu de répression contenant du glucose. Les cultures furent ensuite ajustées à  $DO_{600}=1$ . Ensuite après lavage, des séries de dilution 10x furent déposées soit sur milieu contenant du glucose (Glu, contrôles négatifs), ou sur milieu contenant du galactose (Gal). Les différentes photos furent prises 2 jours après croissance à 30°C.

## 5.6. Techniques relatives aux protéines

### 5.6.1. Analyse par western blot

#### 5.6.1.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) permet de séparer des protéines sur le seul critère de leur poids moléculaire. Un puit est réservé au marqueur de poids moléculaire (P.M.). Nous avons utilisé le Bio Rad Low Range qui contient des protéines dont les P.M. vont d'approximativement 18kDa à 110 kDa.

La durée de migration (40 mA, 300V) est fonction du pourcentage du gel en acrylamide et du poids de la protéine d'intérêt ainsi que des différentes protéines du marqueur. Le bleu de bromophénol du tampon de dénaturation permet de suivre la migration.

#### 5.6.1.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est assuré par électroblot semi-dry. Une différence de potentiel (14 V, 3mA par cm<sup>2</sup> de membrane de nitrocellulose) appliquée perpendiculairement au gel de polyacrylamide, entre celui-ci et une membrane de nitrocellulose permet le transfert des protéines chargées négativement sur la membrane, qui devient une réplique parfaite du gel. La vitesse de transfert des protéines est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

#### 5.6.1.3. Immunodétection

Cette technique de révélation permet de détecter spécifiquement la protéine d'intérêt en utilisant un anticorps primaire dirigé contre un épitope de celle-ci ou un tag qui lui est fusionné.

Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, les sites susceptibles de lier celui-ci de façon non spécifique sont saturés en incubant la membrane overnight à 4°C avec une solution de PBS 1X-Tween 0,05%-Lait en poudre 5%.

- La membrane est incubée une heure sous agitation en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS1X-Tween 0,05%- Lait en poudre 1%.
- Elle est lavée 3 fois 5 min avec du PBS 1X-Tween 0,05%.
- Elle est incubée sous agitation en présence d'un anticorps secondaire dilué dans du PBS1X-Tween 0,05%- Lait en poudre 1%. Il reconnaît le fragment constant de l'anticorps primaire et permet de révéler la présence de la protéine, grâce à la peroxydase qui lui est conjuguée. Cette enzyme catalyse en effet l'oxydation du luminol, une réaction produisant de la lumière.
- Avant révélation, la membrane est de nouveau lavée 3 fois 5 min avec du PBS 1X-Tween 0,05%.

Anticorps primaire (Molecular Probes Invitrogen)	Dilution
Anti-CPY	1 :500
Anti-ALP	1 :100
Anti-PGK	1 :5000
Anti-PrlR	1 :1000
Anti-Flag	1 :1000

Anticorps secondaire	
Anti-souris	1 :5000
Anti-lapin	1 :5000

#### 5.6.1.4. Révélation

La révélation se déroule en chambre noire. La face de la membrane ayant fixé les protéines est recouverte par la solution de révélation. On expose la membrane à un film autoradiographique pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal. L'activité maximale de la peroxydase est atteinte 1 à 5 min après le mélange puis elle décroît en fonction du temps. Le film est plongé dans un bain de révélateur destiné à faire apparaître les bandes, puis dans la solution de fixation avant d'être rincé à l'eau de ville et de sécher à l'air libre.



# Bibliographie

## Bibliographie

- Abdallah, A.I., Commander, N.J., Woodward, M.J., Spencer, S., Hart, C.A., and Winstanley, C. (2003). Type III secretion homologs are present in *Brucella melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis* biovars 1, 2, and 3. *Current microbiology* 46, 241-245.
- Alto, N.M., Shao, F., Lazar, C.S., Brost, R.L., Chua, G., Mattoo, S., McMahon, S.A., Ghosh, P., Hughes, T.R., Boone, C., Dixon, J. E. (2006). Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* 124, 133-145.
- Alvarez-Martinez, C.E., and Christie, P.J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 775-808.
- Anderson, D.M., Fouts, D.E., Collmer, A., and Schneewind, O. (1999). Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12839-12843.
- Bakowski, M.A., Braun, V., and Brumell, J.H. (2008). *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9, 2022-2031.
- Balsalobre, C., Silvan, J.M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E., and Wai, S.N. (2006). Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 59, 99-112.
- Bhavsar, A.P., Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2007). Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* 449, 827-834.
- Brumell, J.H., and Scidmore, M.A. (2007). Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 636-652.
- Campodonico, E.M., Chesnel, L., and Roy, C.R. (2005). A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Molecular microbiology* 56, 918-933.
- Celli, J. (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Research in microbiology* 157, 93-98.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine* 198, 545-556.
- Celli, J., Salcedo, S.P., and Gorvel, J.P. (2005). *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1673-1678.
- Charpentier, X., and Oswald, E. (2004). Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *Journal of bacteriology* 186, 5486-5495.
- Choi, K.H., and Kim, K.J. (2009). Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *Journal of microbiology and biotechnology* 19, 217-228.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annual review of microbiology* 59, 451-485.
- Conover, G.M., Derre, I., Vogel, J.P., and Isberg, R.R. (2003). The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Molecular microbiology* 48, 305-321.
- Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature reviews* 4, 811-825.
- Curak, J., Rohde, J., and Stagljar, I. (2009). Yeast as a tool to study bacterial effectors. *Current opinion in microbiology* 12, 18-23.

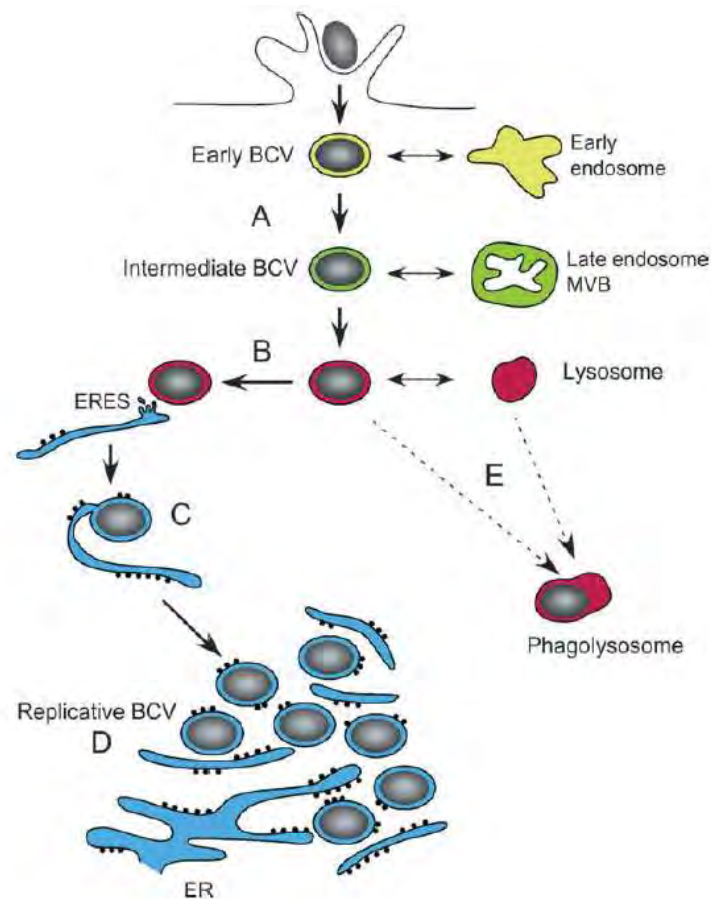
- de Jong, M.F., Sun, Y.H., den Hartigh, A.B., van Dijl, J.M., and Tsolis, R.M. (2008). Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Molecular microbiology* 70, 1378-1396.
- de Keyzer, J., van der Does, C., and Driessen, A.J. (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci* 60, 2034-2052.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K.N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of bacteriology* 172, 6568-6572.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P., and Letesson, J.J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular microbiology* 3, 487-497.
- Derre, I., and Isberg, R.R. (2005). LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infection and immunity* 73, 4370-4380.
- Driessen, A.J., and Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual review of biochemistry* 77, 643-667.
- Fernandez-Moreira, E., Helbig, J.H., and Swanson, M.S. (2006). Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infection and immunity* 74, 3285-3295.
- Filloux, A. (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et biophysica acta* 1694, 163-179.
- Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews* 7, 355-366.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijsskens, C., Ferrooz, J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., et al. (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular microbiology* 7, 687-698.
- Fronzes, R., Christie, P.J., and Waksman, G. (2009a). The structural biology of type IV secretion systems. *Nature reviews* 7, 703-714.
- Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H.R., Orlova, E.V., and Waksman, G. (2009b). Structure of a type IV secretion system core complex. *Science (New York, NY)* 323, 266-268.
- Fugier, E., Salcedo, S.P., de Chastellier, C., Pophillat, M., Muller, A., Arce-Gorvel, V., Fourquet, P., and Gorvel, J.P. (2009). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for *Brucella* replication. *PLoS pathogens* 5, e1000487.
- Galan, J.E. (2009). Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell host & microbe* 5, 571-579.
- Gamazo, C., and Moriyon, I. (1987). Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infection and immunity* 55, 609-615.
- Geddes, K., Worley, M., Niemann, G., and Heffron, F. (2005). Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and immunity* 73, 6260-6271.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C., and Senesi, S. (2002). Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology* 184, 6424-6433.
- Gupta, V. (2007). An update on newer beta-lactamases. *The Indian journal of medical research* 126, 417-427.

- Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* 10, 1788-1795.
- Heidtman, M., Chen, E.J., Moy, M.Y., and Isberg, R.R. (2009). Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cellular microbiology* 11, 230-248.
- Holland, I.B., Schmitt, L., and Young, J. (2005). Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Molecular membrane biology* 22, 29-39.
- Isberg, R.R., O'Connor, T.J., and Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature reviews* 7, 13-24.
- Journet, L., Hughes, K.T., and Cornelis, G.R. (2005). Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review). *Molecular membrane biology* 22, 41-50.
- Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (1989). Membrane protein sorting: biosynthesis, transport and processing of yeast vacuolar alkaline phosphatase. *The EMBO journal* 8, 2241-2250.
- Knodler, L.A., Vallance, B.A., Hensel, M., Jackel, D., Finlay, B.B., and Steele-Mortimer, O. (2003). *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Molecular microbiology* 49, 685-704.
- Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H., and Horikoshi, K. (2000). Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *Journal of bacteriology* 182, 6451-6455.
- Kucharczyk, R., and Rytka, J. (2001). *Saccharomyces cerevisiae*--a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta biochimica Polonica* 48, 1025-1042.
- Kuehn, M.J., and Kesty, N.C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & development* 19, 2645-2655.
- Ladant, D., and Ullmann, A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in microbiology* 7, 172-176.
- Lee, E.Y., Bang, J.Y., Park, G.W., Choi, D.S., Kang, J.S., Kim, H.J., Park, K.S., Lee, J.O., Kim, Y.K., Kwon, K.H., et al. (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* 7, 3143-3153.
- Lee, S.H., and Galan, J.E. (2004). *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Molecular microbiology* 51, 483-495.
- Lee, V.T., and Schneewind, O. (2001). Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes & development* 15, 1725-1752.
- Lesser, C.F., and Miller, S.I. (2001). Expression of microbial virulence proteins in *Saccharomyces cerevisiae* models mammalian infection. *The EMBO journal* 20, 1840-1849.
- Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiau, B., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Tang, C.M., and Letesson, J.J. (2000). Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Molecular microbiology* 38, 543-551.
- Lestrade, P., Dricot, A., Delrue, R.M., Lambert, C., Martinelli, V., De Bolle, X., Letesson, J.J., and Tibor, A. (2003). Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infection and immunity* 71, 7053-7060.
- Li, Z., Clarke, A.J., and Beveridge, T.J. (1998). Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *Journal of bacteriology* 180, 5478-5483.
- Machner, M.P., and Isberg, R.R. (2006). Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Developmental cell* 11, 47-56.
- Macnab, R.M. (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et biophysica acta* 1694, 207-217.

- Mangahas, P.M., Yu, X., Miller, K.G., and Zhou, Z. (2008). The small GTPase Rab2 functions in the removal of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* 180, 357-373.
- Mann, C.J., Royer, C.A., and Matthews, C.R. (1993). Tryptophan replacements in the trp aporepressor from *Escherichia coli*: probing the equilibrium and kinetic folding models. *Protein Sci* 2, 1853-1861.
- Maya, D., Quintero, M.J., Munoz-Centeno M.C., and Cha'vez, S. (2008). Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 30, 979-987
- Nagai, H., Cambronne, E.D., Kagan, J.C., Amor, J.C., Kahn, R.A., and Roy, C.R. (2005). A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 826-831.
- O'Callaghan, D., Cazevieuille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular microbiology* 33, 1210-1220.
- Pierini, R., Cottam, E., Roberts, R., and Wileman, T. (2009). Modulation of membrane traffic between endoplasmic reticulum, ERGIC and Golgi to generate compartments for the replication of bacteria and viruses. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 828-833.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (1998). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and immunity* 66, 5711-5724.
- Raffatellu, M., Sun, Y.H., Wilson, R.P., Tran, Q.T., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H.L., Lawhon, S.D., Figueiredo, J.F., Tsolis, R.M., Adams, L.G., et al. (2005). Host restriction of *Salmonella enterica* serotype Typhi is not caused by functional alteration of SipA, SopB, or SopD. *Infection and immunity* 73, 7817-7826.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P.J., and Tang, C.M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nature reviews* 7, 333-340.
- Remy, I., Ghaddar, G., and Michnick, S.W. (2007). Using the beta-lactamase protein-fragment complementation assay to probe dynamic protein-protein interactions. *Nature protocols* 2, 2302-2306.
- Reznikoff, W.S. (1993). The Tn5 transposon. *Annual review of microbiology* 47, 945-963.
- Robinson, C., and Bolhuis, A. (2004). Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta* 1694, 135-147.
- Rodriguez-Pachon, J.M., Martin, H., North, G., Rotger, R., Nombela, C., and Molina, M. (2002). A novel connection between the yeast Cdc42 GTPase and the Slt2-mediated cell integrity pathway identified through the effect of secreted *Salmonella* GTPase modulators. *The Journal of biological chemistry* 277, 27094-27102.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods (San Diego, Calif)* 14, 381-392.
- Scholle, M.D., and Gerdes, S.Y. (2008). Whole-genome detection of conditionally essential and dispensable genes in *Escherichia coli* via genetic footprinting. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 416, 83-102.
- Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., Vergunst, A.C., Jurado Jacome, E., and Hooykaas, P.J. (2003). Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic acids research* 31, 860-868.

- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D., and Shuman, H.A. (2005). Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4866-4871.
- Siggers, K.A., and Lesser, C.F. (2008). The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell host & microbe* 4, 8-15.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I., and Cornelis, G.R. (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11998-12002.
- Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A., and Celli, J. (2008). *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9, 678-694.
- Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Current opinion in microbiology* 11, 38-45.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-525.
- Sun, Y.H., Rolan, H.G., den Hartigh, A.B., Sondervan, D., and Tsolis, R.M. (2005). *Brucella abortus* virB12 is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. *Infection and immunity* 73, 6048-6054.
- Sun, Y.H., Rolan, H.G., and Tsolis, R.M. (2007). Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *The Journal of biological chemistry* 282, 33897-33901.
- Sykes, R.B., and Matthew, M. (1976). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2, 115-157.
- Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine* 119, S3-10; discussion S62-70.
- Tisdale, E.J. (2003). Rab2 interacts directly with atypical protein kinase C ( $\alpha$ PKC)  $\iota$ /lambda and inhibits  $\alpha$ PKC $\iota$ /lambda-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 278, 52524-52530.
- Tisdale, E.J., Azizi, F., and Artalejo, C.R. (2009). Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C $\{\iota\}$  to associate with microtubules and to recruit dynein. *The Journal of biological chemistry* 284, 5876-5884.
- Tisdale, E.J., and Balch, W.E. (1996). Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. *The Journal of biological chemistry* 271, 29372-29379.
- Tisdale, E.J., Kelly, C., and Artalejo, C.R. (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *The Journal of biological chemistry* 279, 54046-54052.
- Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J., and Hooykaas, P.J. (2000). VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science (New York, NY)* 290, 979-982.
- Vergunst, A.C., van Lier, M.C., den Dulk-Ras, A., and Hooykaas, P.J. (2003). Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. *Plant physiology* 133, 978-988.
- Vergunst, A.C., van Lier, M.C., den Dulk-Ras, A., Stuve, T.A., Ouwehand, A., and Hooykaas, P.J. (2005). Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal

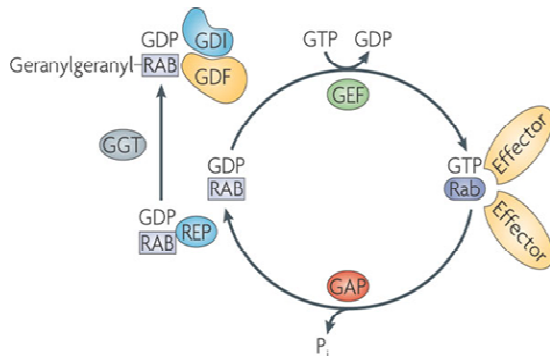
- of the VirB/D4-translocated proteins of Agrobacterium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 832-837.
- Vonderviszt, F., Ishima, R., Akasaka, K., and Aizawa, S. (1992). Terminal disorder: a common structural feature of the axial proteins of bacterial flagellum? *Journal of molecular biology* 226, 575-579.
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., and Matthews, K.R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and environmental microbiology* 66, 4414-4420.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-117.



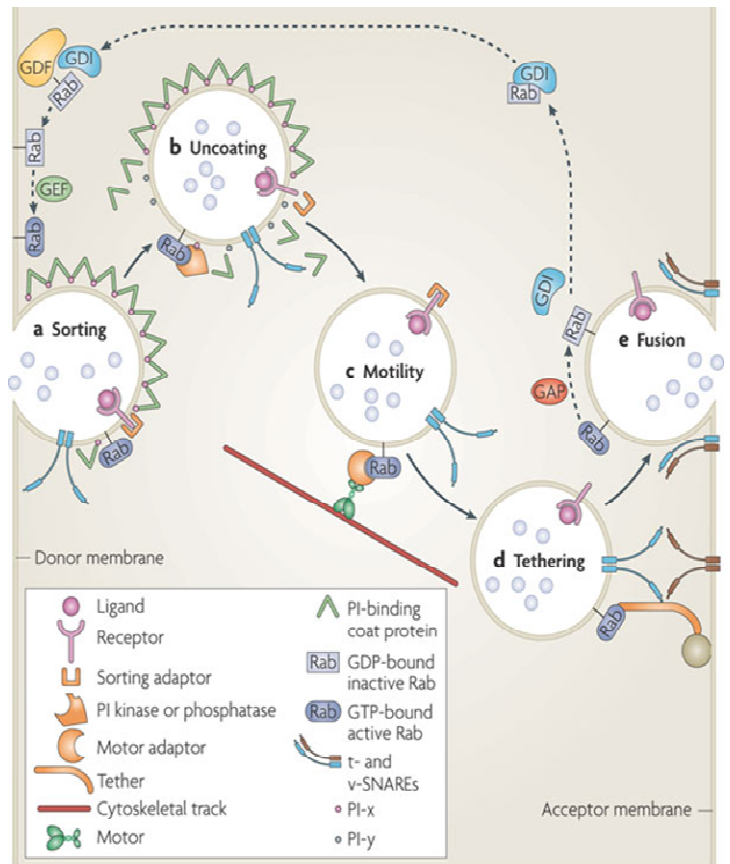
**Figure 1 : Modèle du trafic intracellulaire de *B. abortus* (Starr *et al*, 2008).** A. Une fois dans la cellule, *B. abortus* va résider dans des vacuoles appelées BCV, pour *Brucella* Containing Vacuoles. Ces BCV vont interagir de manière séquentielle avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et même, de façon contrôlée et limitée, avec les lysosomes. B. Les BCV, vont ensuite interagir avec les sites de sortie du réticulum endoplasmique (Endoplasmic Reticulum Exit Sites, ERES), ce qui pourrait leur permettre de fusionner avec le réticulum endoplasmique (C). D. Cette fusion va permettre la mise en place de sa niche de réplication, dans des organelles dérivées du réticulum endoplasmique, permissives à la réplication de *B. abortus* E. Dans le cas où *B. abortus*, ne serait pas capable de sécréter ses protéines effectrices, celle-ci ne pourrait plus saboter le trafic vésiculaire normal, et serait bloquée dans les lysosomes, ce qui provoquerait sa dégradation et empêcherait la mise en place de sa niche de réplication (E). ER : Réticulum Endoplasmique.



A



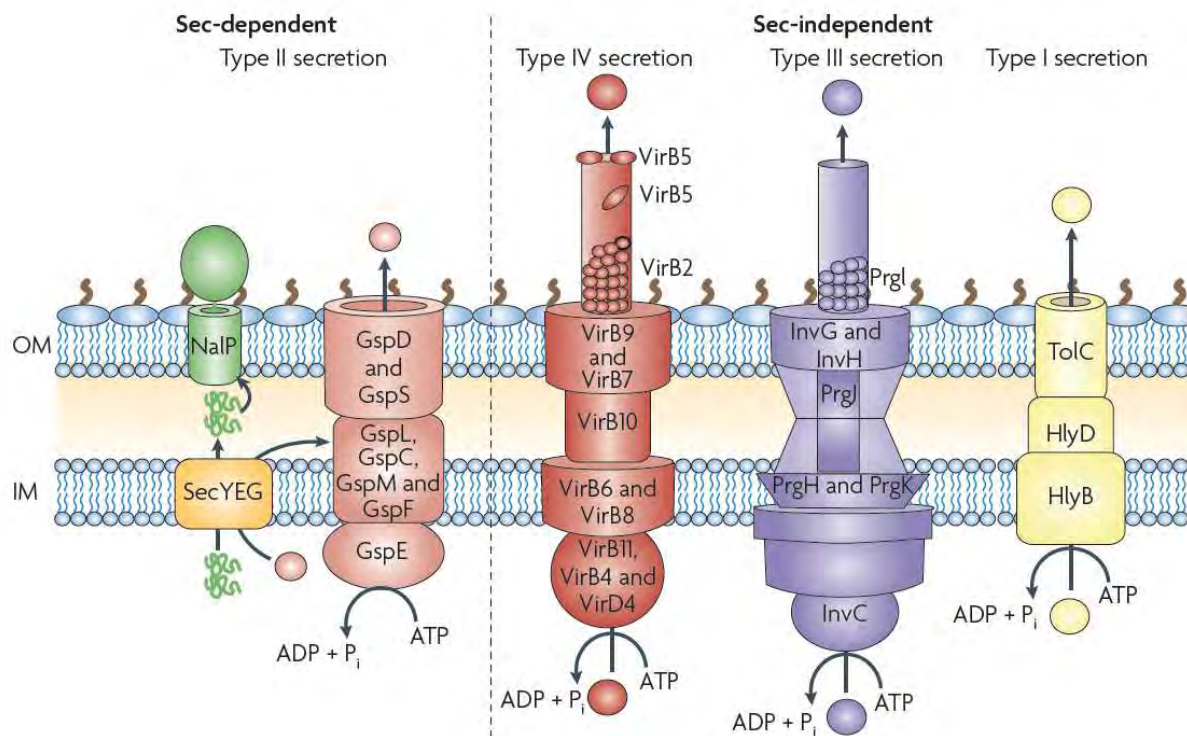
B



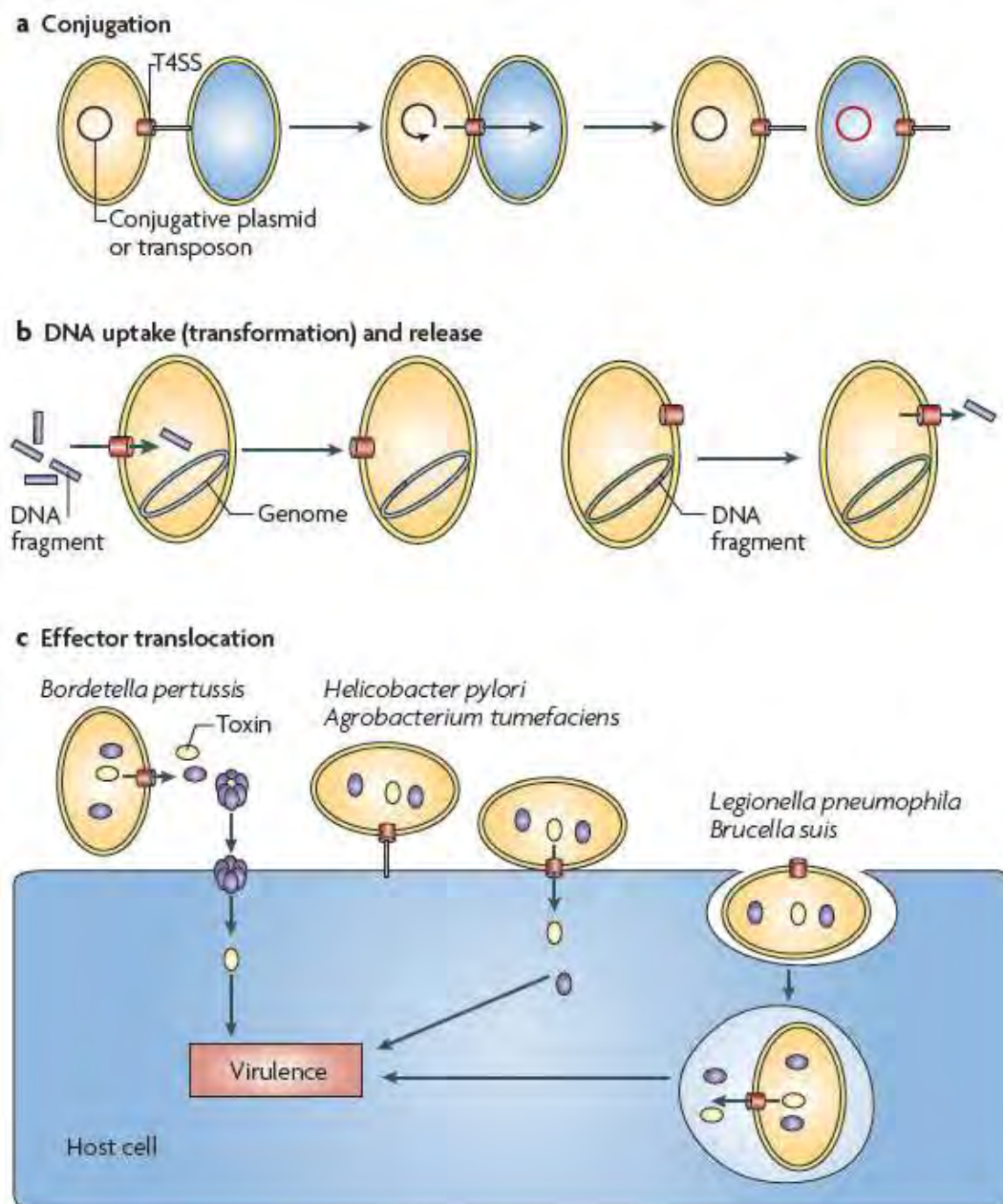
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

### Box I : Les protéines Rab, une large famille de protéines dont Rab2 fait parti (Stenmark, 2009 ; Zerial and McBride, 2001).

Les protéines Rab font partie de la plus large famille de petites GTPase. Ces protéines, ainsi que leurs effecteurs, en participant à la formation, la mobilité et le ciblage de vésicules, vont coordonner les différentes étapes du transport de vésicules d'un compartiment donneur vers un compartiment cible. Les protéines Rab sont retrouvées sous deux formes différentes : la forme active, liée au GTP et la forme inactive liée au GDP. Actuellement, plus de 60 membres de la famille des Rab GTPase sont connus chez l'Homme et insérés en membrane de compartiments intracellulaires spécifiques. Cette association réversible avec les membranes intracellulaires est permise grâce à l'ajout en C-terminal de groupements hydrophobes géranylgéranyl sur un ou deux résidus cystéine. Comme nous pouvons le voir dans Figure A, l'ajout de ce groupement permis par une géranylgéranyl Transférase (GGT), fait partie intrinsèque de la régulation des protéines Rab. Un point central de cette régulation est la conversion, médiée par une Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) de Rab, liée à un GDP en Rab lié à un GTP. Comme nous remarquons sur la Figure B, sous cette forme active des protéines Rab va être reconnue par différents effecteurs (indiqués en orange) et permet la coordination des différentes étapes du trafic vésiculaire. Lors de la formation des vésicules, les protéines Rab (a) peuvent permettre le recrutement des récepteurs spécifiques. (b) Par le recrutement de Phosphoinositide (PI) kinases ou phosphatases, les protéines Rab participent également au démantèlement des « protéines de coating ». (c) Par l'intermédiaire d'effecteur interagissant avec le cytosquelette, les protéines Rab permettent ensuite la mobilité des vésicules. (d) Cette mobilité conduit à l'attachement de la vésicule à la membrane cible. Ceci est médié par l'interaction des protéines de Rab avec des facteurs d'attachement activant les complexes SNAREs permettant l'étape de fusion (e). Après fusion et exocytose, les protéines Rab sont converties en formes inactives par hydrolyse de GTP, par une GTPase-Activating Protein (GAP)(Figure A). Sous leur forme liée au GDP les protéines Rab vont interagir avec des protéines inhibant leur conversion sous forme liée au GTP. Les Rab nouvellement synthétisées vont interagir avec une protéine escorte REP (Rab Escort Protein) qui va permettre l'action de GGT. La forme liée au GDP déjà géranylgéranylée va être reconnue par une protéine plus abondante, un Rab GDP Dissociation Inhibitor (GDI). Le ciblage vers des membranes spécifiques du complexe Rab-GDI est permis par l'interaction avec un GDI Displacement Factor (GDF) en membrane. La protéine Rab2, essentiel au transport entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, fait partie de cette famille de petites GTPase et est associée aux clusters vésiculaires tubulaires (CVT) entre le réticulum endoplasmique et le Cis-Golgi (Tisdale and Balch, 1996). Deux effecteurs de Rab2 ont été identifiés : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et une kinase atypique PKC (Tisdale, 2003 ; Tisdale *et al.*, 2004). Grâce à eux, Rab2 semble contrôler le recrutement de microtubules et d'éléments moteurs vers les CVT (Tisdale *et al.*, 2009). Il a également été montré chez *Caenorhabditis elegans* que Rab2 pouvait avoir un rôle à jouer dans la maturation des phagosomes (Mangahas *et al.*, 2008).



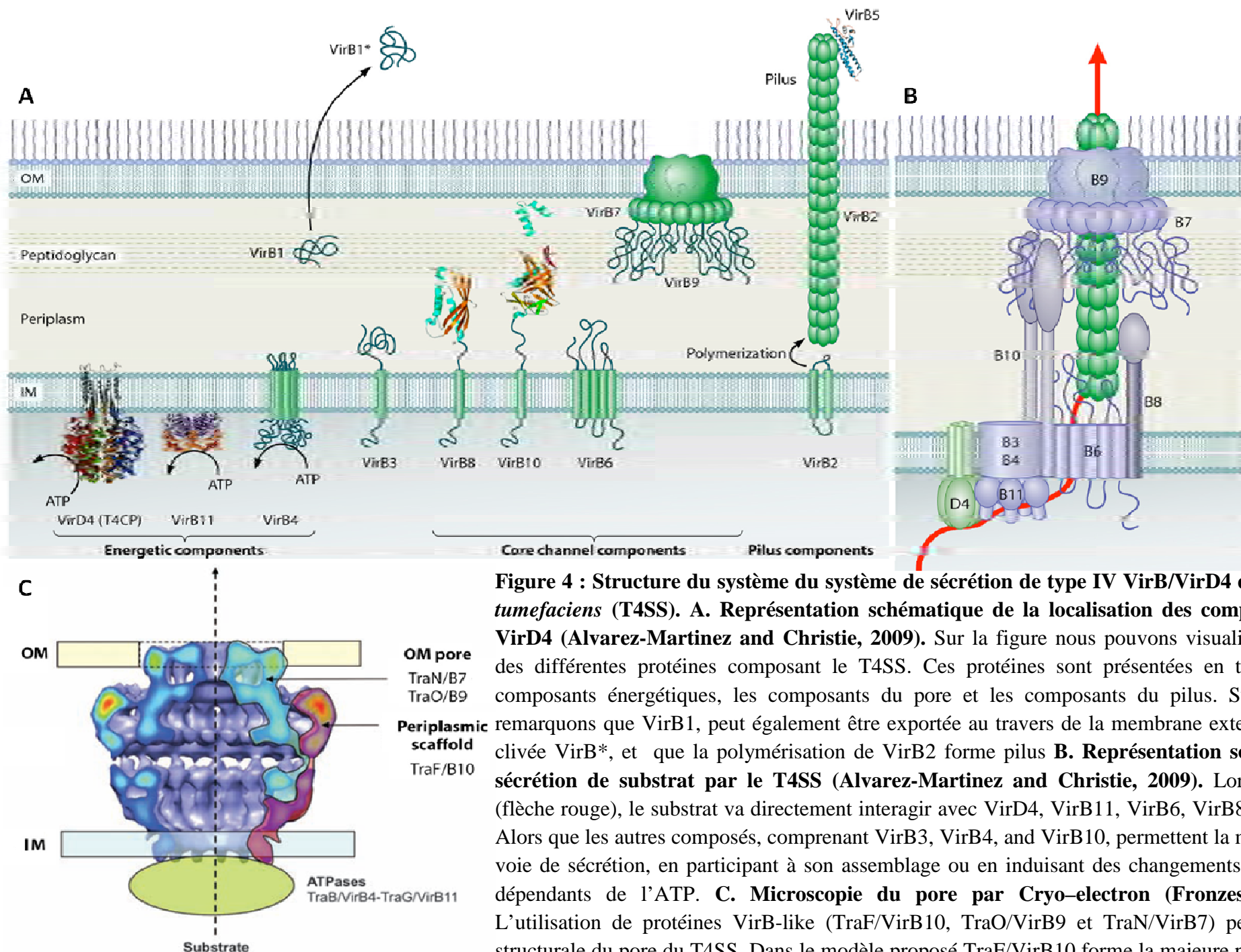
**Figure 2 : Représentation schématique de différents systèmes de sécrétion, chez les bactéries Gram négatives (adapté de Fronzes *et al.*, 2009a).** Le système de sécrétion de **type I (T1SS)**. Représenté ici par le système de sécrétion l'haémolysine chez *Escherichia coli*, le T1SS est un ABC (ATP-Binding Cassette) transporteur, et permet un transport à travers l'enveloppe bactérienne en une seule étape (Holland *et al.*, 2005). **Le système de sécrétion de type II (T2SS)**. Contrairement au T1SS, le T2SS est un système de sécrétion en deux temps, demandant premièrement une translocation du cytosol vers le périplasme, grâce au système Sec par exemple, et une fois dans le périplasme, la protéine est prise en charge par le T2SS qui va permettre sa sécrétion (Lee and Schneewind, 2001). **Le système de sécrétion de type III (T3SS)**. Le T3SS, également appelé injectisome, est un système de sécrétion permettant une sécrétion en une seule étape, et qui est utilisé par différentes bactéries pathogènes, telles que *Salmonella enterica* et *Legionella pneumophila*. Ce T3SS est homologue au flagelle bactérien (Cornelis 2006). **Le système de sécrétion de type IV (T4SS)**. Le T4SS est également un système de sécrétion permettant une sécrétion en une seule étape, ce système, non seulement impliqué dans la sécrétion de protéines effectrices, mais également dans les événements de conjugaison, est expliqué plus en détails dans le texte. IM, membrane interne ; OM, membrane externe.



**Figure 3 : Représentation des différentes sous-familles des systèmes de sécrétion de type IV (Fronzes *et al.*, 2009a).** Les trois sous-familles de T4SS sont indiquées (voir texte pour plus de détails). La première famille regroupe les systèmes de conjugaison, qui permettent le transfert de l'ADN bactérien. La deuxième famille regroupe les systèmes de compétence et de libération d'ADN, permettant les échanges l'ADN avec le milieu extracellulaire sans contact avec des cellules cibles. Et la troisième famille regroupe les systèmes de sécrétion de protéines effectrices.

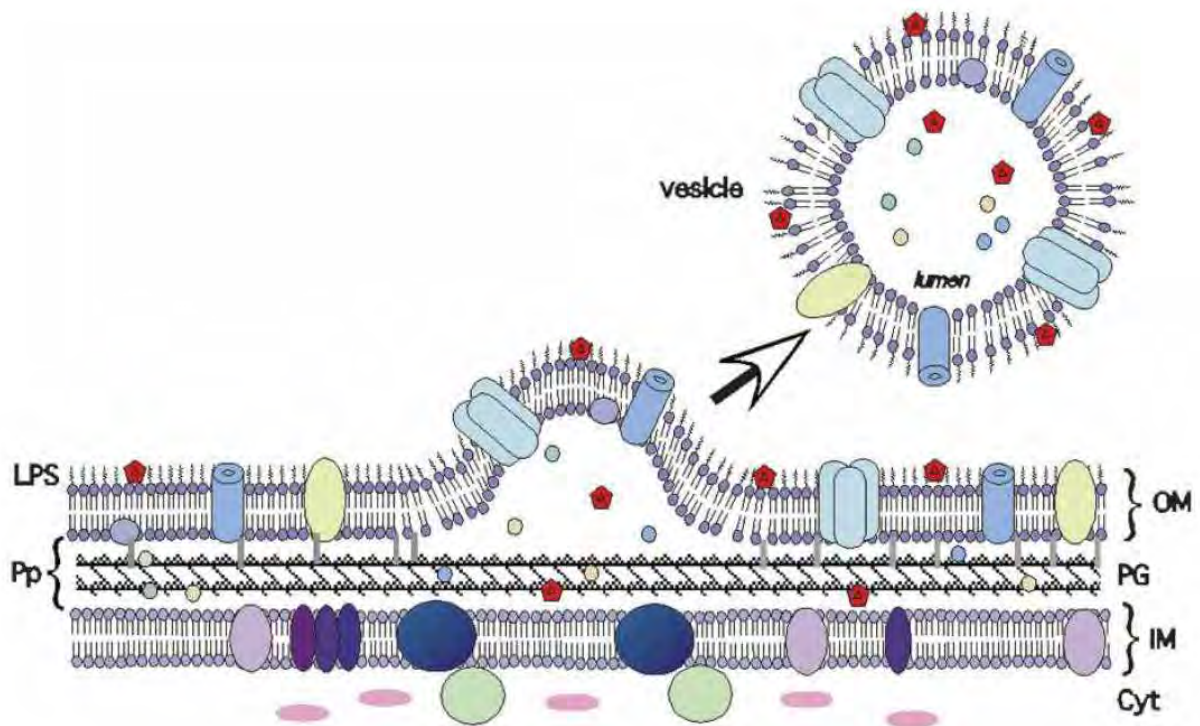






**Figure 4 : Structure du système de sécrétion de type IV VirB/VirD4 de *Agrobacterium tumefaciens* (T4SS). A. Représentation schématisée de la localisation des composants de VirB/VirD4 (Alvarez-Martinez and Christie, 2009).** Sur la figure nous pouvons visualiser la localisation des différentes protéines composant le T4SS. Ces protéines sont présentées en trois groupes : les composants énergétiques, les composants du pore et les composants du pilus. Sur la figure nous remarquons que VirB1, peut également être exportée au travers de la membrane externe sous la forme clivée VirB\*, et que la polymérisation de VirB2 forme pilus **B. Représentation schématisée de la sécrétion de substrat par le T4SS (Alvarez-Martinez and Christie, 2009).** Lors de sa sécrétion (flèche rouge), le substrat va directement interagir avec VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB2 et VirB9. Alors que les autres composés, comprenant VirB3, VirB4, and VirB10, permettent la mise en place de la voie de sécrétion, en participant à son assemblage ou en induisant des changements conformationnels dépendants de l'ATP. **C. Microscopie du pore par Cryo-electron (Fronzes *et al.*, 2009b).** L'utilisation de protéines VirB-like (TraF/VirB10, TraO/VirB9 et TraN/VirB7) permet une analyse structurale du pore du T4SS. Dans le modèle proposé TraF/VirB10 forme la majeure partie de la surface externe du pore et ne prendrait pas directement part au transfert de substrat, mais interviendrait dans l'organisation du complexe. TraO/VirB9 avec TraN/VirB7 forment la partie interne du pore.

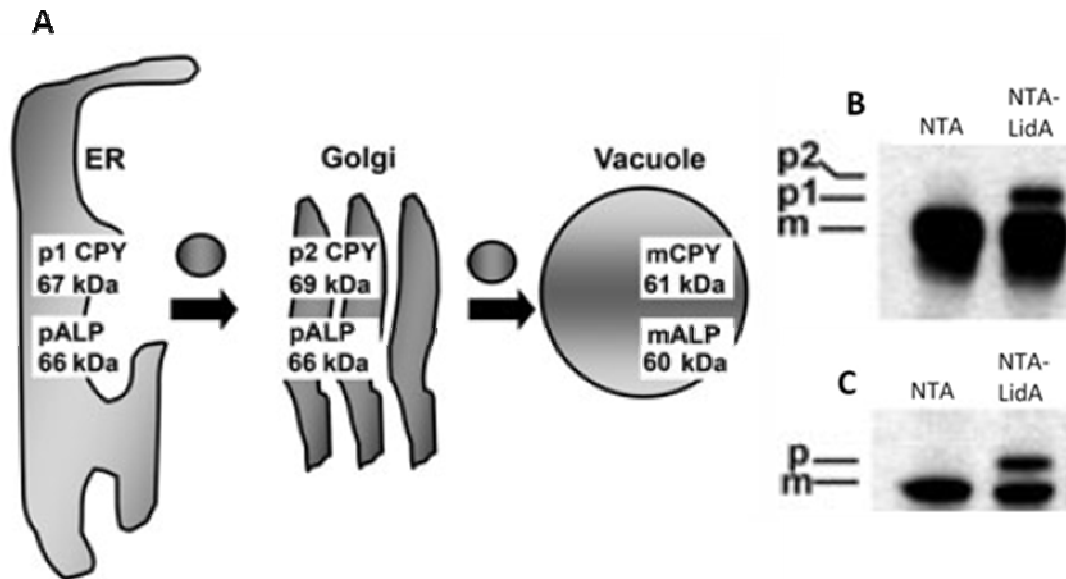




**Figure 5 : Formation des OMVs (Kuehn and Kesty 2005).** Les vésicules dérivées de la membrane externe sont des protéoliposomes composés de phospholipides et de LPS, de protéines de la membrane externe, mais également de protéines périplasmiques. Les vésicules sont donc formées à partir de la membrane externe, et à des endroits où les liens entre le peptidoglycane et la membrane externe sont peu fréquents, absents, ou casés. OM (LPS) Lipopolysaccharide; (Pp) périplasm; (OM) membrane externe; (PG) peptidoglycane; (IM) membrane interne; (Cyt) cytosol.

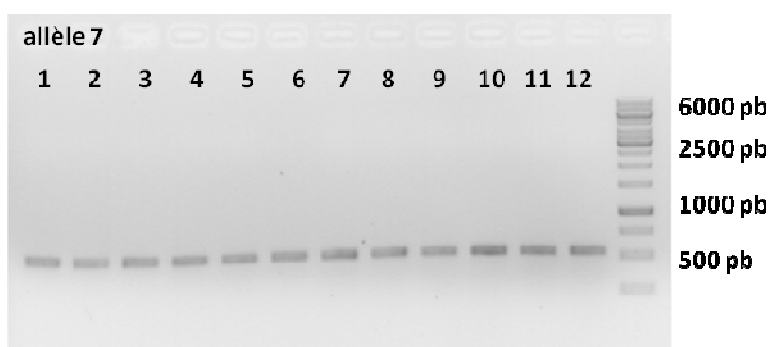




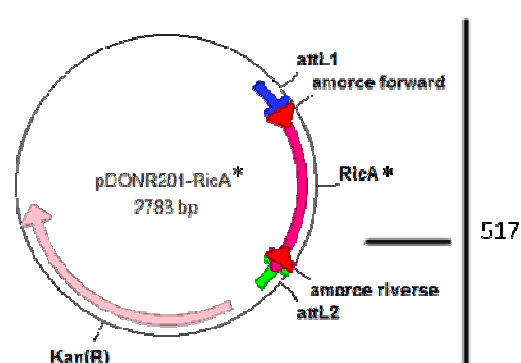


**Figure 7 : Utilisation de l'ALP et de CPY comme rapporteurs protéiques (adapté de Heidtman *et al.*, 2009).** A. Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de l'ALP et de CPY, conduisant à une modification de leur poids moléculaire apparent. B et C. Le principe du test est de produire en levure une protéine bactérienne, et si celle-ci cause un défaut dans le trafic intravésiculaire de la levure, cela peut être visible par une accumulation des précurseurs et de l'ALP et de CPY. Dans ce cas-ci, LidA, un effecteur de *Legionella pneumophila*, a été produit en levure grâce au pYESNTA-LidA (NTA-LidA), et l'on peut clairement voir que la présence de LidA cause l'accumulation des précurseurs de CPY (B) et de l'ALP (C), qui est représentée par l'apparition d'une bande supplémentaire et qui témoigne du dérèglement du trafic intravésiculaire. A l'inverse lorsque LidA n'est pas produite en levure (pYESNTA), la bande supérieure est absente (NTA, B et C). p1, p2, p, précurseur ; m, forme mature.

## 1. PCR sur colonie d'une transformation isolée

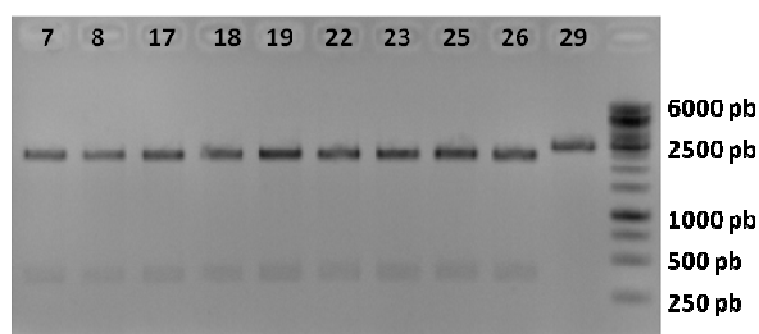


## Tailles attendues après PCR:

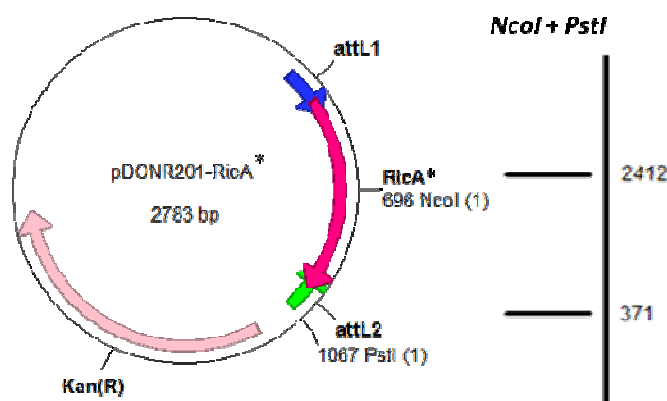


Mélange des clones issus de la même transformation

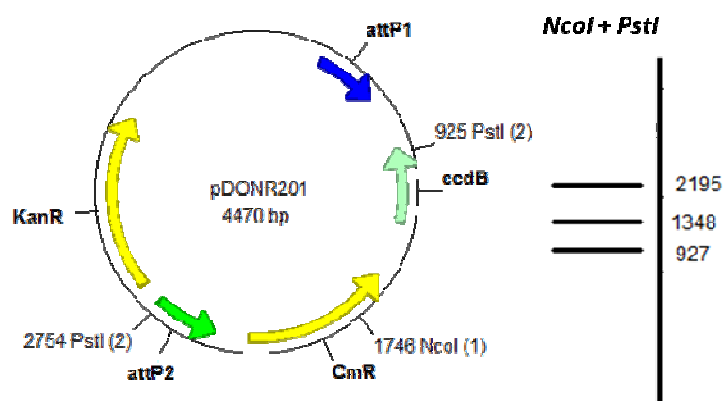
## 2. Restrictions diagnostiques



## Tailles attendues après restriction:

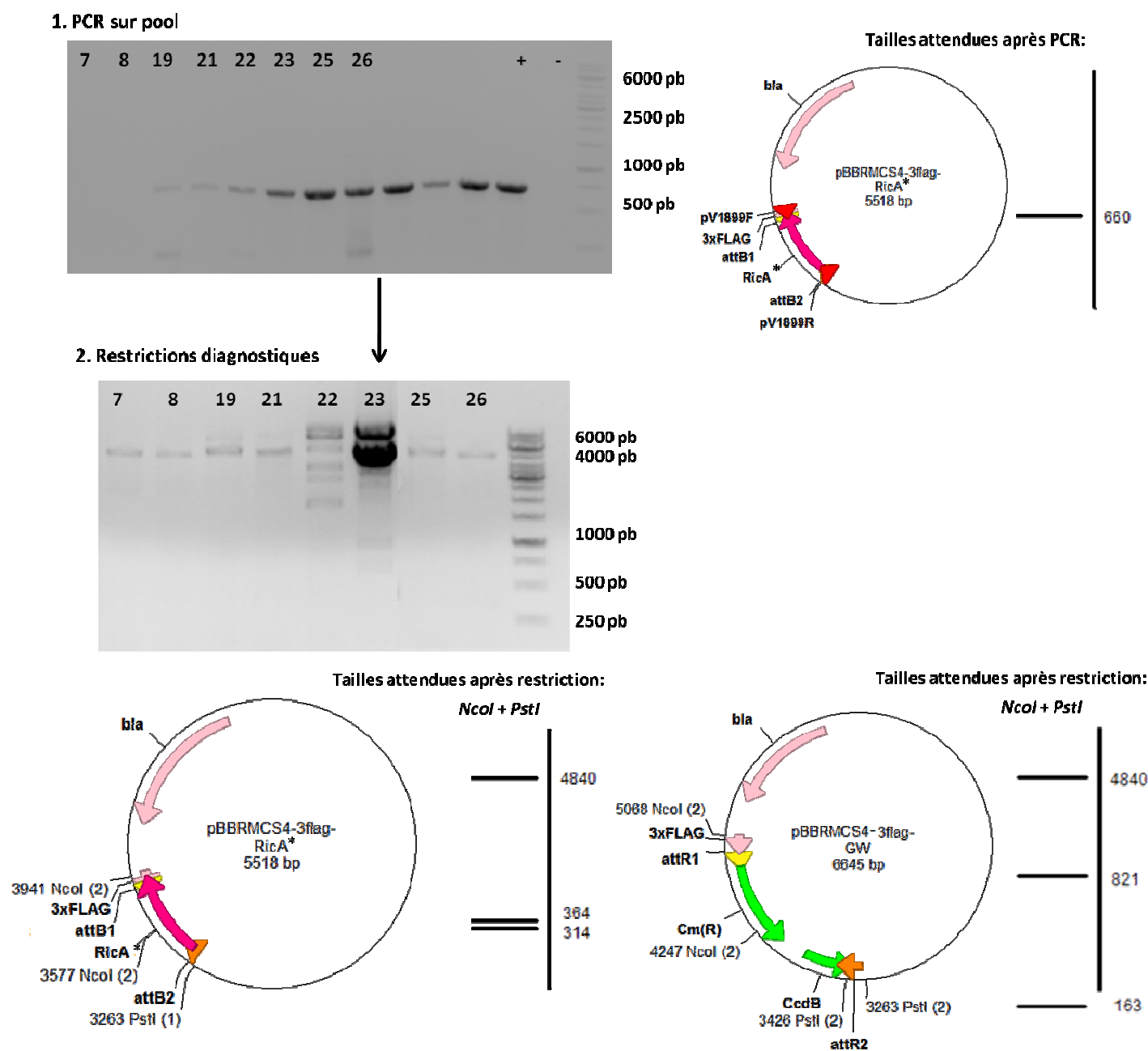


## Tailles attendues après restriction:



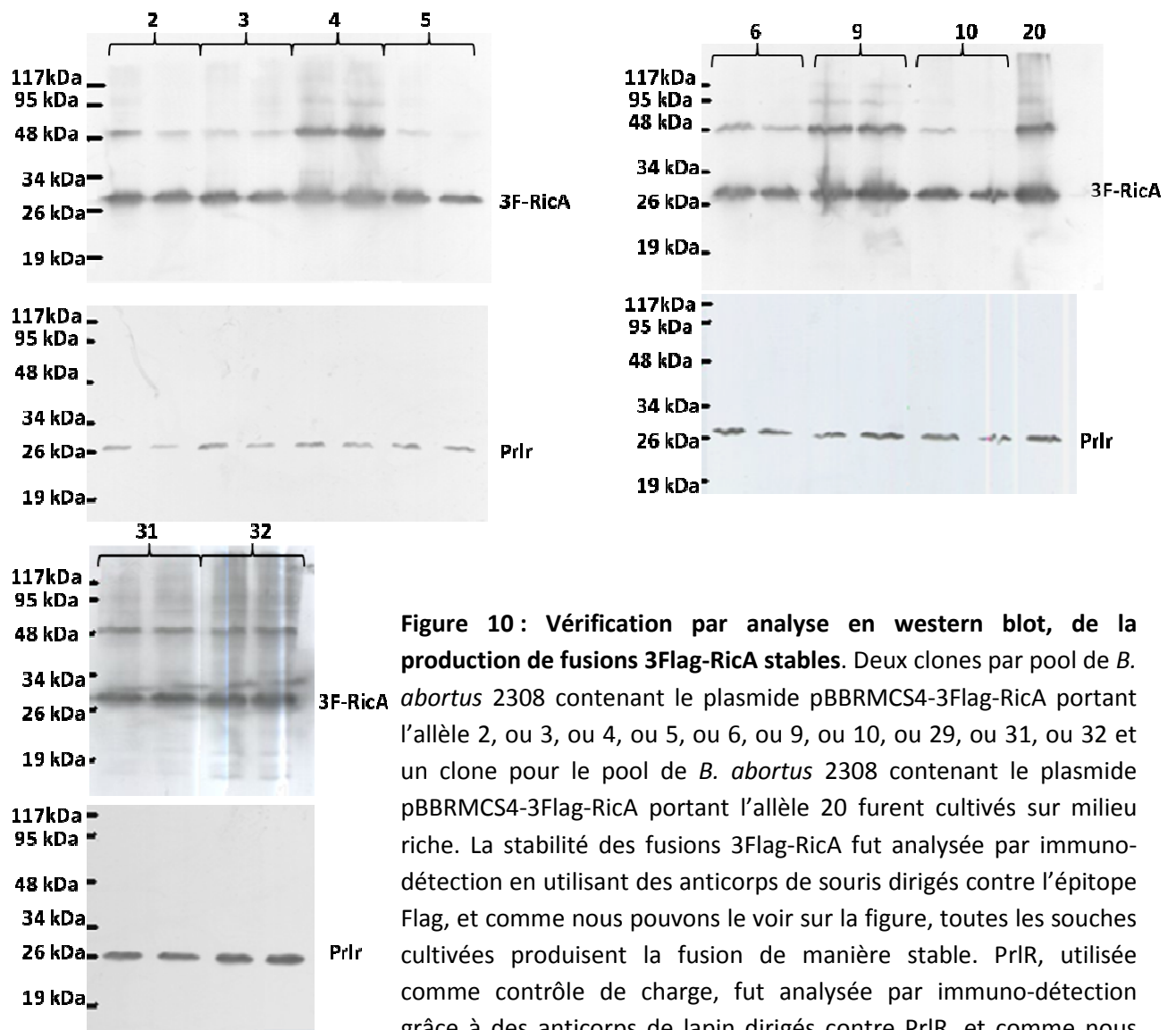
**Figure 8 : Vérification de l'insertion de *ricA\** dans le pDONR201.** Afin d'obtenir des souches d'*E. coli* portant les pDONR201-RicA\* des différents allèles, *E. coli* DH10B fut transformée avec les pDONR201 résultant de la réaction BP, pour ensuite être sélectionnée sur milieu sélectif contenant de la kanamycine. Des PCR sur colonie furent alors effectuées sur des clones d'une transformation isolée (dans ce cas-ci, 12 clones de la souche contenant le pDONR201-RicA\* portant l'allèle 7) afin de permettre la vérification de la présence des plasmides. Sur la figure, nous remarquons que tous les clones montrent une amplification à la taille attendue, indiquant que la réaction BP ainsi que la transformation de *E. coli* furent efficaces. Suite à cette vérification par PCR, tous les clones issus d'une même transformation

(i.e. ici les souches *E. coli* contenant le plasmide pDONR201-RicA\* portant l'allèle 7, ou 8, ou 17, ou 18, ou 19, ou 22, ou 23, ou 25, ou 26, ou 29) furent alors mélangés, et chaque pool fut vérifié séparément par restriction diagnostique. L'enzyme *NcoI*, coupant dans *ricA\** ainsi que dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, et l'enzyme *PstI*, coupant dans le pDONR201 et dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, furent utilisés pour la restriction diagnostique. Comme nous pouvons le voir sur la figure, les tailles attendues après restriction ne sont pas les mêmes si le pDONR201 porte la cassette Gateway<sup>TM</sup>, ou s'il porte *ricA\**. Grâce à cette différence, nous constatons que toutes les souches analysées dans ce cas portaient le pDONR201-RicA\*. Nous pouvons cependant remarquer que la souche portant l'allèle 29 ne montre pas le même profil de restriction, mais cela s'explique par le fait que la mutation de l'allèle 29 touche le site de restriction de *NcoI*.

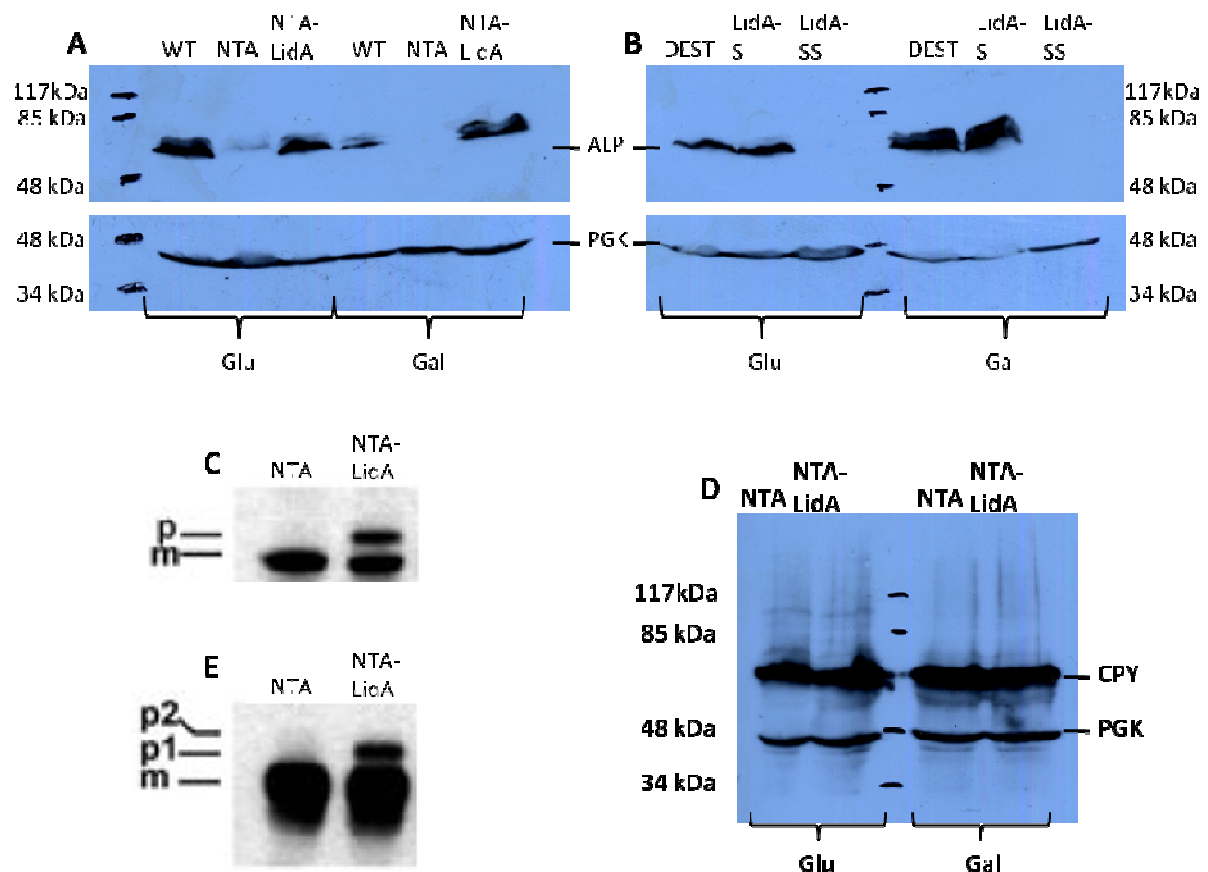


**Figure 9 : Vérification de l'insertion de *ricA*\* dans le pBBRMCS4-3Flag-GW.** Afin d'obtenir des souches d'*E. coli* portant les pBBRMCS4-3Flag-RicA\* des différents allèles, *E. coli* DH10B fut transformée avec les pBBRMCS4-3Flag-RicA\* résultant de la réaction LR, pour ensuite être sélectionnée sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline. Les clones issus d'une même transformation furent ensuite mélangés et des PCR sur pools furent alors effectuées (dans ce cas-ci, sur 8 pools de *E. coli* contenant le pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant l'allèle 7, ou 8, ou 19, ou 21, ou 23, ou 25, ou 26) afin de permettre la vérification de la présence des plasmides. Le pBBRMCS4-3Flag-RicA\* portant l'allèle 14 fut utilisé comme contrôle positif, et un mix PCR contenant de l'eau à la place des bactéries a été utilisé comme contrôle négatif. Sur la figure, les puits non-annotés ne nous intéressent pas. Nous remarquons néanmoins qu'à l'exception des pools 7 et 8, tous les pools montrent une amplification à la

taille attendue, indiquant que la réaction LR ainsi que la transformation de *E. coli* furent, pour la majorité des pools, efficaces. Cependant l'absence d'amplification pour les pools 7 et 8, peut être expliquée par la faible efficacité de la transformation. Suite à cette vérification par PCR, chaque pool fut vérifié séparément par restriction diagnostique. L'enzyme *NcoI*, coupant dans *ricA*\*, dans le pBBRMCS4-3Flag ainsi que dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, et l'enzyme *PstI*, coupant dans le pBBRMCS4-3Flag et dans la cassette Gateway<sup>TM</sup>, furent utilisés pour la restriction diagnostique. Comme nous pouvons le voir sur la figure, les tailles attendues après restriction ne sont pas les mêmes si le pDONR201 porte la cassette Gateway<sup>TM</sup>, ou s'il porte *ricA*\*. Grâce à cette différence, nous constatons qu'à l'exception des pools 22 et 23 toutes les souches analysées dans ce cas portaient le pBBRMCS4-3Flag RicA\*.



**Figure 10 : Vérification par analyse en western blot, de la production de fusions 3Flag-RicA stables.** Deux clones par pool de *B. abortus* 2308 contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA portant l'allèle 2, ou 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 9, ou 10, ou 29, ou 31, ou 32 et un clone pour le pool de *B. abortus* 2308 contenant le plasmide pBBRMCS4-3Flag-RicA portant l'allèle 20 furent cultivés sur milieu riche. La stabilité des fusions 3Flag-RicA fut analysée par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre l'épitope Flag, et comme nous pouvons le voir sur la figure, toutes les souches cultivées produisent la fusion de manière stable. PrlR, utilisée comme contrôle de charge, fut analysée par immuno-détection grâce à des anticorps de lapin dirigés contre PrlR, et comme nous pouvons le constater, il semblerait que le chargement a bien été effectué pour chaque échantillon.

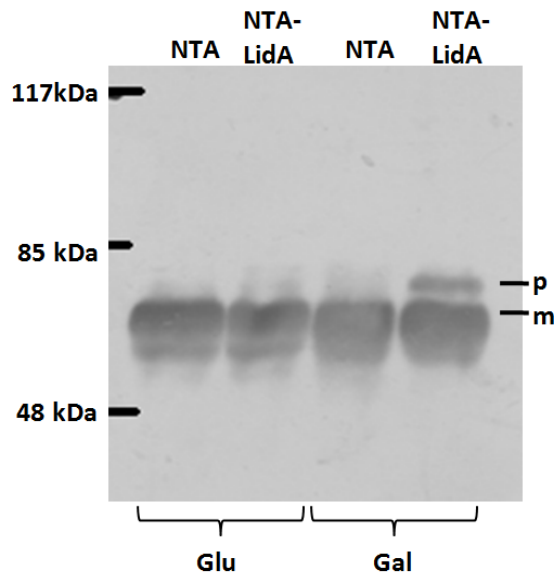


**Figure 11: Utilisation des précurseurs de l'ALP et de la CPY comme témoins du trafic vésiculaire de la levure.** A et B. Les souches BY4742 nt, ou portant le pYESNTA vide (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), ou le pYESDEST52 (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-LidA-SS (LidA-SS), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose en condition de répression (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose en condition d'induction (Gal). Après lyse au NaOH, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les précurseurs de l'ALP furent ensuite analysés par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre l'ALP. La phosphogycérate kinase (PGK) fut utilisée comme contrôle de charge et analysée par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre PGK. Comme nous pouvons le voir sur la figure, certains signaux de l'ALP sont absents (pYESNTA Gal et Glu, pYESDEST52-LidA-SS Glu et Gal) et ce bien que le contrôle de charge indique que tous les échantillons aient été chargés convenablement. De plus, l'accumulation des précurseurs de l'ALP, est visible chez certains contrôles négatifs (pYESDEST52 Gal, nt Gal, pYESNTA-LidA Glu et nt Glu).

C et E. Les souches BY4742 portant le pYESNTA (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), furent cultivées dans du milieu contenant du galactose. Sur la figure, nous pouvons constater que la présence de LidA en levure cause l'accumulation des précurseurs de la CPY (E) et de l'ALP (C). Cette accumulation est représentée par l'apparition d'une bande supplémentaire et qui rapporte un état défectueux du trafic vésiculaire en levure. A l'inverse lorsque LidA n'est pas produite en levure (pYESNTA), la bande supérieure est absente (NTA, E et C) (résultats tirés de Heidtman *et al.*, 2009).

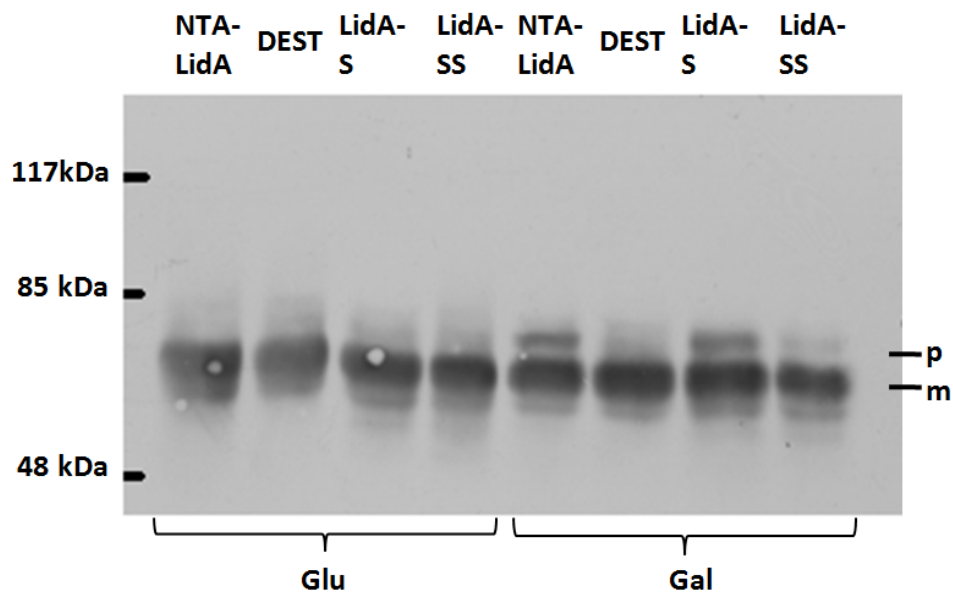
D. Les souches BY4742 portant le pYESNTA (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose (Gal). Après lyse par NaOH, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur

gel SDS-PAGE. Les précurseurs de la CPY furent ensuite analysés par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. La phosphogycérate kinase (PGK) fut utilisée comme contrôle de charge et analysée par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre PGK. Sur la figure nous remarquons qu'aucune des souches ne montre une accumulation des précurseurs de la CPY. Alors que Heidtman *et al.*, 2009 ont montré que la production de LidA en levure par le pYESNTA en milieu Gal provoquait une accumulation des précurseurs de la CPY (E). p1, p2, p, précurseur ; m, forme mature

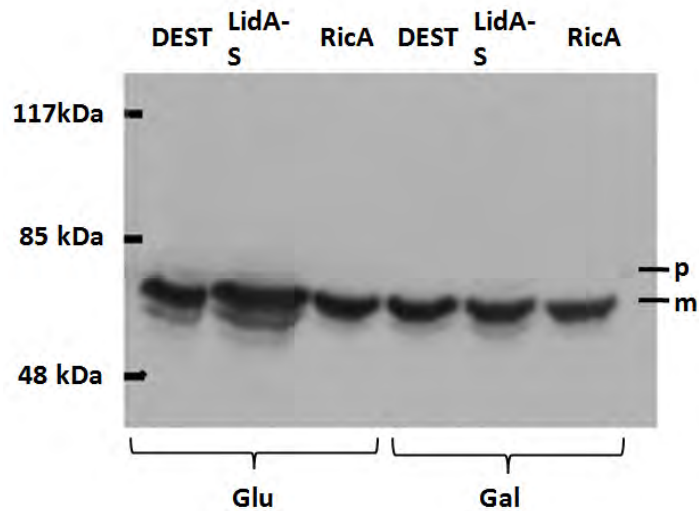


**Figure 12: Analyse par western blot de l'accumulation des précurseurs de la CPY, sur des extraits protéiques obtenus par lyse aux billes de verre.** Les souches BY4742 portant le pYESNTA (NTA), ou le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose (Gal). Après lyse aux billes de verre, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les différentes formes de la CPY furent ensuite analysées par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. Sur la figure, nous pouvons constater que NTA-LidA Gal montre l'apparition d'une bande supérieure représentant les précurseurs de la CPY. Alors que toutes les autres conditions représentant les contrôles négatifs ne montrent pas cette accumulation des précurseurs de la CPY. Ainsi, ces résultats montrent que notre test permet de mettre en évidence l'accumulation des précurseurs de la CPY, causée par la production de LidA en levure, rapportant un dérèglement du trafic vésiculaire en levure. p : précurseurs ; m : forme mature.

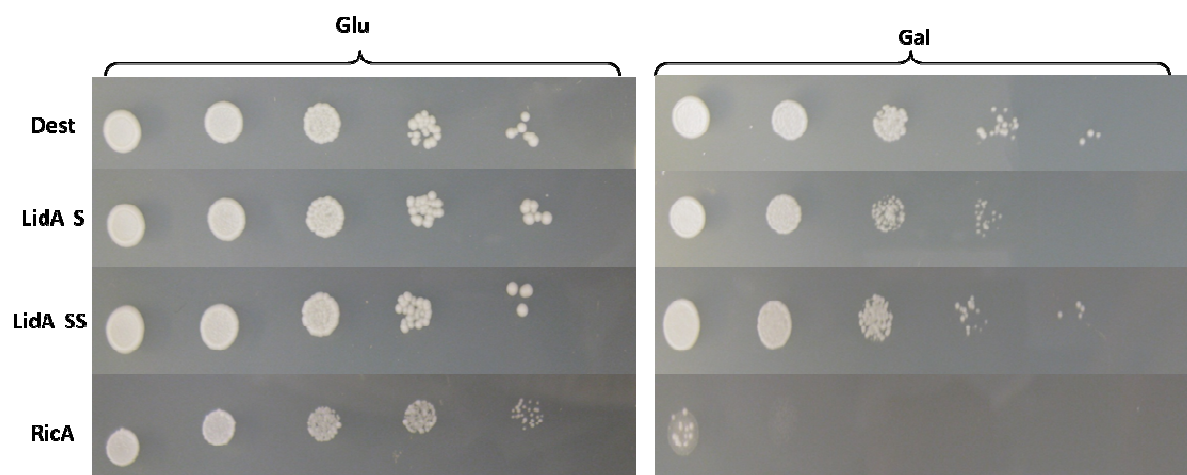




**Figure 13: Analyse par western blot de la CPY afin de tester l'utilisation du pYESDEST52 pour produire LidA en levure.** Les souches BY4742 portant le pYESNTA-LidA (NTA-LidA), ou le pYESDEST52 (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-LidA-SS (LidA-SS), furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose (Gal). Après lyse aux billes de verre, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les différentes formes de la CPY furent ensuite analysées par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. Sur la figure nous pouvons remarquer une accumulation des précurseurs de la CPY dans le cas de NTA-LidA Gal (contrôle positif), ainsi que pour LidA-S Gal. A l'inverse, les souches cultivées dans un milieu contenant du glucose, et le DEST Gal (contrôles négatifs), ne montrent pas cette accumulation. Par ailleurs, nous pouvons observer sur la figure que l'accumulation des précurseurs de la CPY n'est pas très nette dans le cas de LidA-SS Gal. Il semblerait donc que l'utilisation du pYESDEST52, afin de produire des protéines bactériennes en levure, est permise dans notre approche expérimentale. Cependant, la séquence codante insérée dans le pYESDEST52 semble devoir posséder son codon stop, afin de permettre un effet de la protéine d'intérêt suffisant à la visualisation de l'accumulation des précurseurs de la CPY. p : précurseurs ; m : forme mature.



**Figure 14: Caractérisation de l'effet RicA sur le trafic vésiculaire de la levure par analyse western blot de la CPY** Les souches BY4742 portant le pYESDEST52 (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-RicA, furent cultivées soit dans un milieu contenant du glucose en condition de répression (Glu), soit dans un milieu contenant du galactose en conditions d'induction (Gal). Après lyse aux billes de verre, les extraits protéiques obtenus furent chargés sur gel SDS-PAGE. Les formes de la CPY furent ensuite analysées par immuno-détection en utilisant des anticorps de souris dirigés contre la CPY. Sur la figure, nous pouvons voir qu'aucune souche ne montre une accumulation des précurseurs de la CPY, à l'exception de LidA-S Gal (contrôle positif). Néanmoins, en ce qui concerne LidA-S Gal, l'accumulation des précurseurs de la CPY est représentée par une bande très faiblement visible. p : précurseurs ; m : forme mature.



**Figure 15: Caractérisation de la cytotoxicité de LidA et de RicA en levure.** Les souches de levure BY4742 portant le plasmide pYESDEST52 vide (DEST), ou le pYESDEST52-LidA-S (LidA-S), ou le pYESDEST52-LidA-SS (LidA-SS), ou le pYESDEST52-RicA (RicA) furent cultivées overnight dans un milieu de répression contenant du glucose. Les cultures furent ensuite ajustées à  $DO_{600}=1$ . Ensuite après lavages, des séries de dilution 10x furent déposées soit sur milieu contenant du glucose (Glu, contrôles négatifs), ou sur milieu contenant du galactose (Gal). Les différentes photos furent prises 2 jours après croissance à 30°C. Alors que les souches LidA-S et LidA-SS, montre une croissance comparable aux contrôles négatifs (DEST sur galactose, et les souches ayant été cultivées sur glucose), RicA montrent très clairement une forte cytotoxicité. Cette toxicité est d'ailleurs légèrement visible sur milieu contenant du glucose par la visualisation de plus petites colonies par rapport au contrôle négatif.